



Patent- og
Varemærkestyrelsen

(12) Oversættelse af
europæisk patentskrift

(51) Int.Cl.: C 11 B 3/00 A 21 D 8/04 A 23 K 1/165 C 12 N 1/15 C 12 N 1/21
C 12 N 9/20 C 12 N 15/55 C 12 N 15/80 C 13 D 3/00 C 13 K 1/08
// (C 12 R 1:66 C 12 R 1:77) C 12 R 1:19

(45) Oversættelsen bekendtgjort den: 2003-01-27

(80) Dato for Den Europæiske Patentmyndigheds
bekendtgørelse om meddelelse af patentet: 2002-10-30

(86) Europæisk ansøgning nr.: 97610056.0

(86) Europæisk indleveringsdag: 1997-12-09

(87) Den europæiske ansøgnings publiceringsdag: 1998-10-07

(30) Prioritet: 1996-12-09 DK 140896 1996-12-16 DK 143296 1997-02-21 DK 19097
1997-02-26 DK 21197 1997-11-11 DK 128397

(84) Designerede stater: AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU NL PT SE

(73) Patenthaver: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark

(72) Opfinder: Clausen, Ib Groth, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Pøtker, Shamkant Anant, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Borch, Kim, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Halkier, Torben, Hestkøvej 11E, 3460 Birkerød, Danmark
Barfoed, Martin, 4708 Royal Troon Drive, Raleigh, NC 27604, USA
Clausen, Kim, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Fuglsang, Claus Crone, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark
Dybdal, Lone, Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, Danmark

(74) Fuldmægtig i Danmark: Novozymes A/S, Krogshøjvej 36, 2880 Bagsværd, Danmark

(54) Benævnelse: Reduktion af phosphor-indeholdende bestanddele i spiseolier; som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase, en phospholipase fra en trådsvamp, der har en phospholipase A og/eller B aktivitet

(56) Fremdragne publikationer:

EP-A- 0 130 064

EP-A- 0 622 446

EP-A- 0 654 527

WO-A-97/05219

WO-A-98/18912

JP-A- 7 231 788

US-A- 5 264 367

BUCHOLD H: "ENZYMATISCHE PHOSPHATIDENTIFER-
NUNG AUS PFLANZENÖLEN" FETT WISSENSCHAFT
TECHNOLOGIE- FAT SCIENCE TECHNOLOGY, vol. 95, no. 8,
1 August 1993 (1993-08-01), pages 300-304, XP000385706
DATABASE WPI Section Ch, Week 9030 Derwent Publicati-
ons Ltd., London, GB; Class D16, AN 90-226962
XP002107471 -& JP 02 153997 A (SHOWA SANGYO CO), 13
June 1990 (1990-06-13)
DATABASE WPI Section Ch, Week 9013 Derwent Publicati-
ons Ltd., London, GB; Class D16, AN 90-096521

fortsættes

BEST AVAILABLE COPY

XP002107472 -& JP 02 049593 A (SHOWA SANGYO CO), 19 February 1990 (1990-02-19)

NAGAO TOSHIHIRO ET AL: "Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY (TOKYO), vol. 116, no. 3, 1994, pages 536-540, XP002157254 ISSN: 0021-924X

MASUDA N ET AL: "PRIMARY STRUCTURE OF PROTEIN MOIETY OF *PENICILLIUM-NOTATUM* PHOSPHOLIPASE B DEDUCED FROM THE CDNA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 202, no. 3, 1991, pages 783-788, XP000971864 ISSN: 0014-2956

Opfindelsens område

5 Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til reduktion af indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase.

10 Den foreliggende opfindelse angår yderligere et enzym med phospholipase-aktivitet, en klonet DNA-sekvens, der koder for enzymet med phospholipase-aktivitet, en fremgangsmåde til frembringelse af enzymet og anvendelse af nævnte enzym til en række industrielle formål.

Opfindelsens baggrund

15 Enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en relativ stor mængde ikke-hydrerbart phosphorindhold

20 Anvendelsen af phospholipase til enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm) til at reducere phosphorindholdet i nævnte vanddegummeret spiseolie er velkendt.

25 Denne proces kan imidlertid forbedres yderligere, især til udførelse af enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor (NHP) og/eller relativt store mængder af mucilago.

Følgelig er et formål for opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i sådanne olier, hvor nævnte fremgangsmåde omfatter anvendelse af en phospholipase.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen

35 Phospholipider, såsom lecithin eller phosphatidylcholin, består af glycerol, der er esterificeret med to fedtsyrer i den ydre (sn-1) og den midterste (sn-2) position og esterificeret med phosphorsyre i den tredje position; phosphorsyren igen kan være esterificeret til en aminoalkohol. Phospholipaser er enzymer, der tager del i hydrolysen af phospholipider. Adskillige typer af phospholipase-aktivitet kan skelnes fra hinanden, herunder phospholipaseme

A₁ (PLA₁) og A₂ (PLA₂), som hydrolyserer én fedtsyregruppe (i henholdsvis sn-1- og sn-2-positionen) til frembringelse af lysophospholipid, og lysophospholipase (eller phospholipase B (PLB)), som kan hydrolysere den resterende fedtsyregruppe i lysophospholipid.

5

Denne opfindelse angår blandt andet en phospholipase fra en trådsvamp, som har evnen til at hydrolysere den ene og/eller begge fedtsyregrupper i et phospholipid (det vil sige fremviser PLA- og/eller PLB-aktivitet).

10

Tidligere karakteriserede PLA- og/eller PLB-enzymmer fra svampe

Talrige referencer beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser. For at gøre det lettere at få et overblik over status inden for området, er referencerne blevet grupperet i to afsnit.

15

Afsnit ét vedrører referencer, som beskriver identificeringen af svampe-phospholipaser, som man aktuelt ikke mener er beslægtede med svampe-phospholipasen ifølge den foreliggende opfindelse. Disse referencer er hovedsageligt indbefattet for at sammenfatte status inden for området karakterisering af svampe-phospholipaser.

20

Afsnit to vedrører referencer, som beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser, som menes at være relevante for svampe-phospholipaserne ifølge den foreliggende opfindelse.

25

Afsnit ét

Enzymer med phospholipase A- og/eller B-aktivitet er blevet fundet i forskellige svampekilder, herunder *Penicillium notatum* (der også er kendt som *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem. 77:1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5):393-401, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem. 49(4):1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem. 269:19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (gammelt navn *Saccharomyces rosei*; Y. Kuwabara, Agric. Biol. Chem. 52(10):2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters 124:29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60(7):1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-

30

35

zyme™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; Process Biochemistry 30(5):393-401 (1995)) og *Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., Agric. Biol. Chem. 43(3):517-525, 1979).

5 Afsnit to

EP 575133 A2 beskriver isoleringen og karakteriseringen af en svampe-phospholipase A1, som er opnået fra *Aspergillus*, og anvendelsen deraf til industrielle formål.

10

Der er ingen sekvensinformation (hverken DNA- eller aminosyre-) indbefattet i ansøgningen, ej heller er nogen strategi eller noget forslag til kloning af noget af *Aspergillus*-phospholipasen beskrevet eller anført i ansøgningen.

15

Tsung-Che et al. (Phytopathological notes 58:1437-38 (1968)) beskriver kort karakteriseringen af en phospholipase fra *Fusarium solani*.

20

EP 130 064 beskriver en isoleret fraktion af et fermenteringsmedium, der fremviser lipase-aktivitet, som er opnået fra stammen *Fusarium oxysporum* DSM 2672. Ydermere er anvendelsen deraf i detergentsammensætninger beskrevet. EP 130 064 beskriver imidlertid ikke denne fraktion som fremvisende phospholipase-aktivitet.

25

WO 96/13579 beskriver en lipase, som er opnået fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94, herunder dens N-terminale sekvens.

WO 96/13579 beskriver imidlertid ikke noget enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

30

En cDNA-sekvens, som koder for en lipase fra *Fusarium heterosporum* er beskrevet (Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*, J. Biochem. 116:536-540, 1994). Denne sekvens menes aktuelt at være den DNA-sekvens, der er mest beslægtet med en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)). Denne reference beskriver imidlertid

35

ikke noget enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet.

5 En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne klonede DNA-sekvens har imidlertid meget begrænset homologi med en DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)).

Industriel anvendelse af phospholipaser

10 En række anvendelser af phospholipaser er kendte, såsom anvendelse af phospholipase i for eksempel enzymatisk degummering af en vanddegummet olie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm), behandling af stivelseshydrolysat (især fra hvedestivelse) til forbedring af filtrerbarheden (EP 219 269, CPC International), som tilsætningsstof til brøddøj til at forbedre brødets elasticitet (US 4 567 046, Kyowa Hakko), og til fremstilling af
15 lysolecithin med specielle emulgerende egenskaber.

Aktuelt anvendes phospholipasen Lecitase® (Novo Nordisk A/S) kommercielt til for eksempel degummering af olier. Lecitase® er et mammalia-enzym, som er opnået fra svinepancreas.
20

Det er velkendt, at det er muligt at danne svampeenzymer rekombinant med opnåelse af industrielt økonomisk acceptable udbytter, især fra trådsvampe.

Følgelig er det et formål for denne opfindelse at tilvejebringe en forbedret phospholipase til anvendelse for eksempel i processerne, der er beskrevet ovenfor.
25

Det er endvidere et formål for den foreliggende opfindelse at beskrive processer og fremgangsmåder til rekombinant produktion med industrielt acceptable udbytter af en phospholipase, som er opnået fra en trådsvamp.
30

Sammendrag af opfindelsen

35 Vanddegummering af spiseolier udføres ved hjælp af ekstraktion med vand. Ved denne behandling efterlades en del af phosphatiderne i olien. Denne del beskrives ved hjælp af fællesbetegnelsen "ikke-hydrerbare phosphatider" (NHP). Ved produktionen af olier er det essentielt at fjerne NHP-indholdet (US

5 264 367).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i en olie, som omfatter en relativ stor mængde af NHP.

5

Følgeligt angår opfindelsen i et første aspekt en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som har et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, der er målt ved hjælp af:

10

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

15

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

20

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer, og

25

vi) herefter udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien,

og hvor nævnte fremgangsmåde omfatter:

30

kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5-8 og en vandig opløsning af en phospholipase A1, en phospholipase A2 eller en phospholipase B, idet opløsningen emulgeres i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

35

I et andet aspekt angår opfindelsen en ny klonet phospholipase.

5 Yderligere undersøgelser af karakteren af lipase-aktiviteten, som findes i *Fusarium oxysporum* DSM 2672 (og er beskrevet i EP 130 064), viste, at den isolerede fraktion omfatter adskillige bestanddele med lipase-aktivitet, hvoraf den ene fremviste phospholipase-aktivitet.

10 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klonet et enzym, som fremviser phospholipase A-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, mere specifikt *Fusarium oxysporum*.

15 Dette er første gang en phospholipase A fra en trådsvamp er blevet klonet, og følgelig tilvejebringer den foreliggende opfindelse en klonet DNA-sekvens, som koder for et phospholipase A-enzym fra en trådsvamp.

Følgelig angår ét aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, som koder for et polypeptid med phospholipase A-aktivitet, hvor DNA-sekvensen er opnået fra en trådsvamp.

20 En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet i Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991.

25 Denne DNA-sekvens fremviser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og endvidere varierer en fysiologisk egenskab, såsom molekylemassen, betydeligt mellem nævnte PLB fra *P. notatum* (66 kDa) og en phospholipase ifølge opfindelsen (29 ± 10 kDa (se nedenfor)).

30 Endvidere har en sammenligning med kendte nukleotid- og aminosyresekvenser vist, at DNA-sekvensen og/eller den tilsvarende kodede aminosyresekvens ifølge opfindelsen kun har ringe homologi med alle kendte DNA- og/eller aminosyresekvenser (se nedenfor).

35 Følgelig mener man aktuelt, at DNA-sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning, vil være meget værdifuld til for eksempel kloning af en anden beslægtet/homolog phospholipase-kodende DNA-sekvens, da en specifik hybridiseringsprobe og/eller PCR-primere nu let kan konstrueres på

basis af nævnte DNA-sekvens ifølge opfindelsen.

5 Yderligere mener man aktuelt, at det er muligt at klonе både en beslægtet/homolog phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning.

10 Følgelig angår opfindelsen i et yderligere aspekt en klonet DNA-sekvens, som koder for et enzym, der fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

(a) den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

15 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1, eller den komplementære streng dertil,

20 (c) en DNA-sekvens, der er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),

25 (d) en DNA-sekvens, der er defineret i (a) eller (b), som koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

30 (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, ved lav stringens,

35 (f) en DNA-sekvens, som koder for et polypeptid, der har de samme aminosyresekvenser i positionresterne 1 til 346, 31 til 303 eller 31 til 303 i SEQ ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

(g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specificeret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).

5 Endvidere er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet grundigt karakteriseret, og det har vist sig, at den har phospholipase-aktivitet ved lavt pH, denne egenskab gør den meget egnet til anvendelse til oliedegummering. Phospholipasen er ikke membranbundet, hvilket gør den egnet til kommerciel produktion og oprensning.

10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

- 15 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
- ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
- iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
- 20 iv) et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
- v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C.

25 En udledt aminosyresekvens for en isoleret phospholipase ifølge opfindelsen er vist i SEQ ID NO: 2.

30 Den N-terminale aminosyresekvens for en moden secerneret isoleret phospholipase er blevet bestemt. Nævnte N-terminale sekvens viste, at den modne del af en phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, starter i aminosyre nr. 31 i SEQ ID NO: 2. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

35 Endvidere er den C-terminale sekvens for en aktiv secerneret phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, blevet bestemt. Nævnte C-terminal-bestemte phospholipase blev rekombinant

udtrykt i trådsvampestammen *Aspergillus oryzae*. Se forsøgseksempel heri for yderligere henvisning.

- 5 Disse resultater viste, at enzymet blev C-terminalt processeret under ekspression fra *A. oryzae*, og resultaterne tyder på, at Ser303 i SEQ ID NO: 2 er den mest sandsynlige C-terminale rest i det udtrykte modne aktive enzym. Det forudses imidlertid, at endnu yderligere C-terminal processering kan finde sted (det vil sige, som frembringer et fragment af nævnte sekvenser), og at man stadig har et udtrykt modent aktivt enzym.
- 10 Følgelig angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller B-aktivitet og er valgt fra gruppe, der omfatter:
- 15 (a) et polypeptid, som kodes af den phospholipase A- og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 20 (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
- (c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- 25 (d) en analog til polypeptider, der er defineret i (a), (b) eller (c), idet analogen er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og
- (e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).
- 30 I endnu et yderligere aspekt tilvejebringer opfindelsen en rekombinant ekspressionsvektor, som åbner mulighed for heterolog rekombinant produktion af et enzym ifølge opfindelsen. Det er derved muligt at lave en stærkt oprenet phospholipase-sammensætning, som er kendetegnet ved at være fri for homologe urenheder. Det er yderst fordelagtigt til en række industrielle
- 35 anvendelser.

Den foreliggende opfindelse viser eksperimentelt (se nedenfor), at en

phospholipase, der er opnået fra en stamme af *Fusarium culmorum* og *Fusarium oxysporum*, har forbedrede egenskaber til anvendelse til industrielle relevante formål. Det forudses, at phospholipaser, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, vil have forbedrede egenskaber, der er relevante til anvendelse til anvendelse til industrielle formål.

Følgeligt angår opfindelsen i endnu et yderligere aspekt anvendelsen af en phospholipase, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *Fusarium oxysporum*, i en proces, der omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtsyregrupperne.

Endelig angår opfindelsen en isoleret, i det væsentlige ren biologisk kultur af *Escherichia coli*-stammen DSM 11299, som indeholder en phospholipase-kodende DNA-sekvens (den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299), der er opnået fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, eller en hvilket som helst mutant af nævnte *E. coli*-stamme, som har bevaret den phospholipase-kodende egenskab.

Homologisammenligning med kendte sekvenser

Der blev udført en homologisøgning med phospholipasen ifølge opfindelsen mod nukleotid- og proteindatabaser. Homologisøgningen viste, at den tættest beslægtede kendte sekvens var en lipase fra *Fusarium heterosporum* (en parallelstilling af aminosyrer er vist i figur 1).

DNA-sekvensen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 1, 23-1060), som koder for phospholipasen, viser kun 62 % DNA-homologi med den kendte lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum* (Genbank-databasereference S77816), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 60 % homologi med en udledt aminosyresekvens på basis af den kendte DNA-sekvens ovenfor (se figur 1).

Dette viser, at DNA- og/eller aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen rent faktisk er forskellig fra alle kendte DNA- og/eller

aminosyresekvenser.

5 En cDNA-sekvens, der koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum* er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne DNA-sekvens (Genbank-databasereference X60348) viser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 20 % lighed med en udledt aminosyresekvens, der er baseret på den kendte PLB-DNA-sekvens
10 ovenfor.

Beregningerne af homologi blev udført som beskrevet senere i denne specifikation.

15 Tegninger

Figur 1: Parallelopstilling af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2 med en kendt lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum*.

20 Figur 2: Sammenligning af enzymatisk degummeringsevne hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen.

Definitioner

25 Før en mere detaljeret gennemgang af denne opfindelse vil følgende udtryk blive defineret.

30 "En klonet DNA-sekvens": Udtrykket "en klonet DNA-sekvens" henviser til en DNA-sekvens, der er klonet ifølge standard-kloningsprocedurer, som anvendes ved gensplejsning til at flytte et segment af DNA fra dens naturlige placering til et andet site, hvor det vil blive reproduceret. Kloningsprocessen inddrager udskæring og isolering af det ønskede DNA-segment, insertion af DNA-stykket i vektormolekylet og inkorporering af den rekombinante vektor i en celle, hvor talrige kopier eller kloner af DNA-segmentet vil blive replikeret.

35

Den "klonede DNA-sekvens" ifølge opfindelsen kan alternativt benævnes "en DNA-konstruktion", "et klonet polynukleotid med en DNA-sekvens" eller "en

isoleret DNA-sekvens".

5 "Opnået fra": Til formålet i den foreliggende opfindelse betyder udtrykket "opnået fra" som anvendt heri i forbindelse med en specifik mikrobiel kilde, at enzymet og følgelig DNA-sekvensen, der koder for nævnte enzym, er dannet af den specifikke kilde eller af en celle, hvori et gen fra kilden er blevet indsat.

10 "Et isoleret polypeptid": Som defineret heri henviser udtrykket "et isoleret polypeptid" eller "en isoleret phospholipase" som anvendt om phospholipasen ifølge opfindelsen til en phospholipase eller phospholipasedel, som i det væsentlige er fri for andre ikke-phospholipase-polypeptider, for eksempel mindst 20 % ren, fortrinsvis mindst 40 % ren, mere fortrinsvis 60 % ren, endnu mere fortrinsvis 80 % ren, mest fortrinsvis 90 % ren og endnu mest fortrinsvis 95 % ren, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE.

15 Når det isolerede polypeptid er mindst 60 % rent kan udtrykket "et stærkt isoleret polypeptid" anvendes. Det "isolerede polypeptid" kan alternativt benævnes "oprenset polypeptid".

20 "Homologe urenheder": Som anvendt heri betyder udtrykket "homologe urenheder" en hvilken som helst urenhed (for eksempel et andet polypeptid end enzymet ifølge opfindelsen), som stammer fra den homologe celle, hvorfra enzymet ifølge opfindelsen oprindeligt er opnået. I den foreliggende opfindelse kan den homologe celle for eksempel være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

25 "Phospholipase-kodende del": Som anvendt heri betyder udtrykket "phospholipase-kodende del", når det anvendes i forbindelse med en DNA-sekvens, det område af DNA-sekvensen, som svarer til det område, der er translateret til en polypeptidsekvens.

30 I DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, er det området mellem den første "ATG"-startkoden ("AUG"-kodon i mRNA) og den følgende stopkodon ("TAA", "TAG" eller "TGA").

35 Det translaterede polypeptid kan yderligere foruden den modne sekvens, som fremviser phospholipase-aktivitet, omfatte et N-terminalt signal og/eller en

propeptidsekvens. Signalsekvensen styrer almindeligvis sekretionen af polypeptidet, og propeptidet styrer almindeligvis foldningen af polypeptidet. For yderligere information se Egnell, P., et al., *Molecular Microbiol.* 6(9):1115-19 (1992) eller Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

"Modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens": Udtrykket "modifikation(er)", der anvendes i forbindelse med modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens som beskrevet heri, defineres til at indbefatte kemisk modificering såvel som genmanipulation(er). Modificeringen eller modificeringerne kan være substitution, deletion og/eller insertion i aminosyren eller aminosyre af interesse.

"Phospholipase A": Udtrykket "phospholipase A", som anvendes heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen, påtænkes at dække et enzym med phospholipase A1- og/eller phospholipase A2-aktivitet.

Phospholipase A1 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.32.

Officielt navn: phospholipase A1 (PLA1).

Katalyseret reaktion:

phosphatidylcholin + h(2)o <>

2-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

Kommentar(er): har en meget bredere specificitet end EC 3.1.1.4.

Phospholipase A2 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.4.

Officielt navn: phospholipase A2 (PLA2).

Alternativt navn(e): phosphatidylcholin 2-acylhydrolase, lecithinase a, phosphatidase eller phosphatidolipase.

Katalyseret reaktion:

phosphatidylcholin + h(2)o <>

1-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

Kommentar(er): virker også på phosphatidylethanolamin, cholinplasmalogen og phosphatider, idet den fjerner fedtsyren, der er bundet til 2-positionen.

"Phospholipase B": defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC

3.1.1.5.

Officielt navn: lysophospholipase.

Alternativt navn(e): lecithinase b, lysolecithinase, phospholipase b eller plb.

Katalyseret reaktion:

5 2-lysophosphatidylcholin + h(2)o <> glycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

10 "Phospholipase-aktivitet": Udtrykket "phospholipase-aktivitet" eller "har/fremviser phospholipase-aktivitet" påtænkes som anvendt heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen at specificere et enzym, som mindst har den mængde phospholipase-aktivitet (hvad enten det er PLA eller PLB), der defineres eksperimentelt nedenfor.

15 Følgelig defineres et enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet, heri som et enzym, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6 heri (se nedenfor), har en phospholipase-aktivitet på mindst 0,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C.

25 Man mere på nuværende tidspunkt, at kun et enzym med en sådan signifikant phospholipase-aktivitet har industriel interesse, for eksempel til anvendelse til degummering (US 5 264 367).

30 "En lipase med phospholipase-sideaktivitet": Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgelig som en lipase med en phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal.

35 En række lipaser har en sådan phospholipase-sideaktivitet. I forsøgseksempel 6 heri (se nedenfor) er vist nogle af lipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

"En råolie": En råolie (kaldes også en ikke-degummet olie) kan være en presset eller ekstraheret olie eller en blanding deraf fra for eksempel rapsfrø,

5 sojabønne eller solsikke. Phosphatid-indholdet i en råolie kan variere fra 0,5-3 % (vægt/vægt) svarende til et phosphorindhold i intervallet 200-1200 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 250-1200 ppm. Bortset fra phosphatideme indeholder råolien også små koncentrationer af carbohydrater, sukkerforbindelser og metal/phosphatidsyre-komplekser med Ca, Mg og Fe.

10 "En semiråolie": En hvilken som helst olie, som ikke er en råolie, men som har et phosphatid-indhold på over 250 ppm, mere fortrinsvis på over 500 ppm. En sådan olie kunne for eksempel opnås ved at udsætte en råolie for en proces tilsvarende "vanddegummet olie"-processen, der er beskrevet nedenfor.

15 "En vanddegummet olie": En vanddegummet olie opnås typisk ved at blande 1-3 % (vægt/vægt) varm vand med varm (60-90 °C) råolie. Sædvanlige behandlingstider er 30-60 minutter. Vanddegummingstrinet fjerner phosphatideme og slimagtige gummier, som bliver uopløselige i olien, når de hydreres. De hydrerede phosphatider og gummier kan separeres fra olien ved hjælp af fældning, filtrering eller centrifugering - idet centrifugering er den mest almindelige metode.

20 Det essentielle formål med nævnte vanddegummeringsproces er at separere de hydrerede phosphatider fra olien. Blandingen af varmt vand i olien, der er beskrevet ovenfor, skal heri forstås bredt som blanding af en vandig opløsning i olien ifølge kendte standard-vanddegummeringsprocedurer.

25 Alternativt kan processen, som her benævnes "vanddegumming af olie", kaldes "vådaffinering til fjernelse af mucilago" (se US 5 264 367).

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

30 En fremgangsmåde til enzymatisk degumming af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbare phosphatider/phospholipider

35 Til den foreliggende opfindelse måles mængden af ikke-hydrerbart phosphor i en spiseolie ved hjælp af:

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie =

4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

- 5 ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,
- iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,
- 10 iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,
- v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand (til bundfældning) i 24 timer, og
- 15 vi) efter bundfældning udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien.

For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 Som illustreret i forsøgseksemplerne heri varierer phospholipidsammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) betydeligt i forskellige spiseolier. Følgelig vil niveauet af resterende phospholipid i forskellige vanddegummede olier variere over et bredt interval (for eksempel fra ca. 30 ppm til 200 ppm).

25 Til enzymatisk degummering afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede efter vanddegummering eller citronsyre/vand-forbehandling som defineret ovenfor.

30 Endvidere gælder det, at jo højere mængden af ikke-hydrerbare phosphatider, som er til stede i olien, er, jo mere effektiv er den enzymatiske degummeringsmetode.

35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i olie, som omfatter en relativ høj mængde af NHP.

Fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 60 ppm, mere fortrinsvis mindst 100 ppm og endnu mere fortrinsvis mindst 200

ppm.

5 Mere fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold i intervallet 60-500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 100-500 ppm og endnu mere fortrinsvis i intervallet 200-500 ppm.

10 En spiseolie, der ifølge beskrivelsen heri er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor kan være en vanddegummeret olie eller mere fortrinsvis en råolie eller en semiråolie.

15 Følgelig angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelse, hvor nævnte spiseolie er en råolie, som er kendetegnet ved at nævnte råspiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er en olie med et phosphorindhold på over 250 ppm (part per million), idet olien ikke er blevet vanddegummeret (vanddegummering omfatter blanding af varmt vand i en varm råolie, efterfulgt af fjernelse af phosphatider, som bliver uopløselige i olien, når den hydreres) før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

20 En sådan råspiseolie har fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold på over 350 ppm, mere fortrinsvis over 400 ppm, endnu mere fortrinsvis over 500 ppm, og mest fortrinsvis over 600 ppm.

25 Nævnte råspiseolie har endvidere fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold i intervallet 250-1500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 350-1500 ppm, endnu mere fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm og mest fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm.

30 Den enzymatiske degummeringsmetode af en råspiseolie ifølge opfindelsen er fordelagtig i forhold til kendte metoder til enzymatisk degummering af vanddegummede spiseolier (US 5 264 367), da en direkte enzymatisk degummeringsmetode til behandling af en råolie ifølge opfindelse vil spare det første trin med vanddegummering af olien.

35 Dette sparer både tid og penge. En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande varmt vand i varm (60-90 °C) råolie i sædvanligvis 30-60 minutter. I

modsatning hertil kan den fulde proces til enzymatisk degummering af råolier ifølge opfindelsen udføres på mindre end 1 time med faktisk enzymatisk behandling i ca. 25 minutter. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

- 5 Endvidere kan en spiseolie, der er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor ifølge beskrivelsen heri, være en semiråolie.

- 10 Følgelig angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelsen, hvor nævnte spiseolie er en semirå spiseolie, som er kendetegnet ved at nævnte semirå spiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har et phosphorindhold på over 500 ppm, og hvor nævnte olie er blevet vanddegummeret før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

- 15 Nævnte halvrå spiseolie er fortrinsvis en olie, som før udførelse af nævnte fremgangsmåde har et phosphorindhold på over 600 ppm, mere fortrinsvis over 750 ppm.

- 20 Almindeligvis vil vanddegummering af en spiseolie reducere phosphorindholdet i olien til et niveau på under 500 ppm.

- 25 Følgelig er en semiråolie som beskrevet heri for eksempel måske kun blevet delvist vanddegummeret før udførelse af en fremgangsmåde til reduktion af niveauet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen.

- 30 Udtrykket "delvist vanddegummeret" angiver, at vanddegummeringsproceduren af olien kun har været en delvis/kort proces sammenlignet med en standard-vanddegummeringsprocedure.

- 35 En "delvis vanddegummerings"-proces kan udføres ved kun at blande 0,5 % varmt vand i olien (standard er 1-3 % varmt vand. Se afsnittet "Definitioner" heri) eller ved at reducere behandlingstiden til 10 minutter (standard er 30-60 minutter).

Alternativt kan en semiråolie som defineret heri være en blanding af en råolie og en semiråolie.

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde ifølge en hvilken som helst del af det første aspekt af opfindelsen, som omfatter følgende trin:

- 5 i) justering af temperaturen i spiseolien til en temperatur mellem 25 °C og 70 °C,
- 10 ii) forbehandling af spiseolien til ovennævnte justerede temperatur ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand, i 5-120 minutter, hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien,
- 15 iii) justering af pH i vand/olie-emulsionen til en pH mellem 1,5 og 8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning),
- 20 iv) kontaktbringning mellem vand/olie-emulsionen og en vandig opløsning af en phospholipase (ved en temperatur (± 5 °C), der er justeret ifølge trin i)), idet phospholipasen er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm,
- v) separering af vandfasen fra den behandlede olie.
- 25 Temperaturen i spiseolien i trin i) umiddelbart ovenfor justeres fortrinsvis til en temperatur, som er den optimale temperatur for phospholipase-aktivitet for enzymet, der anvendes i fremgangsmåden.
- 30 For den kommercielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) er denne ca. 60 °C, og for en phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra trådsvampeslægten *Fusarium*, er den ca. 45 °C. Se forsøgseksempler heri for yderligere detaljer angående dette emne.
- 35 Det forudses, at hovedparten af trådsvampe-phospholipaseme vil have et temperaturoptimum omkring 35-50 °C.
- Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen fremgangsmåden, der er beskrevet umiddelbart ovenfor, hvor temperaturen i spiseolien i trin i) justeres til en temperatur mellem 35 °C og 50 °C, og phospholipasen, der anvendes i

trin iv) er opnået fra en trådsvampestatte.

5 I trin ii) i fremgangsmåden ovenfor forbehandles spiseolien ved den justerede temperatur (trin i)) ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand i 5-120 minutter, og hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien.

10 Dette trin er et standard-forbehandlingstrin ved enzymatisk degummering af spiseolier (US 5 264 367, US 5 558 781). Formålet med trin ii) er at hydrere de hydrerbare/hydrofile bestanddele (såsom det hydrerbare phosphorindhold) i spiseolien, som, når de hydreres, bliver uopløselige i olien.

15 Dette trin er imidlertid anderledes end, hvad man benævner "vanddegummering af en spiseolie" i den foreliggende forbindelse. En vigtig forskel er, at nævnte forbehandlingstrin ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien. Fjernelse af nævnte hydrerede indhold fra olien er hovedformålet med vanddegummering af spiseolier.

20 Følgelig omfatter olien stadig, når phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv) ovenfor, nævnte hydrerede phosphatider og mucilago.

25 Med andre ord beskriver fremgangsmåden ovenfor, hvis spiseolien er en ikke-vanddegummet spiseolie, en simplificeret degummeringsmetode, som ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien, før nævnte olie bringes i kontakt med phospholipasen.

30 Den vandige opløsning, som omfatter mindst 85 % vand (trin ii ovenfor), omfatter fortrinsvis yderligere citronsyre. Der er fortrinsvis mellem 1-15 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning, mere fortrinsvis er der mellem 3-11 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning.

Tidsrummet i trin ii) er fortrinsvis 15-50 minutter, og mere fortrinsvis 15-30 minutter.

35 For yderligere detaljer angående nævnte forbehandling i trin ii) ovenfor henvises til forsøgseksemplerne heri.

- 5 I trin iii) ovenfor justeres pH i vand/olie-emulsionen til pH 1,5-8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning). Dette gøres for at justere pH-værdien i olien, før phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv). Almindeligvis vil den faktiske optimale pH-værdi afhænge af hvilket enzym, der anvendes til at blive bragt i kontakt med olien i trin iv). For yderligere detaljer angående dette emne henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 10 Almindeligvis foretrækkes det ifølge det første aspekt af opfindelsen og udførelsesformer for dette, at kontaktbringningen mellem nævnte olie og en vandig opløsning, som omfatter en phospholipase, udføres ved pH 1,5-6, mere fortrinsvis ved pH 3-6.
- 15 pH-værdien i vandet i olie-emulsionen måles ved at udtage 2 ml vand fra olie-emulsionen og blande dem med 2 ml vand. Efter faseseparering skal det resulterende øverste olielag pipetteres fra, og pH skal måles i vandfasen. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af følgende formel: $pH_{\text{real}} = pH_{\text{målt}} - 0,38$. For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 20 I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er mængden af en phospholipase, som er emulgeret i olien, i intervallet 0,1-15 mg enzym (tørstof)/kg olie, mere fortrinsvis 0,25-5 mg enzym (tørstof)/kg olie og endnu mere fortrinsvis 0,25-2,5 mg enzym (tørstof)/kg olie.
- 25 Almindeligvis er det fordelagtigt at optimere både mængden af anvendt phospholipase og den anvendte tid til enzymatisk degummering af en spiseolie til opnåelse af et phosphorindhold på under 11 ppm. Den faktiske optimale enzymdosis og tiden vil blandt andet afhænge af hvilken phospholipase, der anvendes. For yderligere detaljer vedrørende optimering af enzymdosis og tiden for fremgangsmåden henvises til forsøgseksemplerne heri.
- 30 I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet fortrinsvis til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,5-6 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 1-6 timer, mere fortrinsvis reduceres
- 35

phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,25-2,5 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

5

Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer vedrørende bestemmelsen af optimale temperaturer for individuelle phospholipaser.

10

I alle aspekter og udførelsesformer for en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet i olien fortrinsvis ti mindre end 5 ppm.

15

Phosphorindholdet i olien måles som ppm (parts per million) i oliefasen i vandet, der er til stede i olieemulsionen. Analysen af phosphorindhold udføres i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7. udg. (1987)". For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er opnået fra en pattedyreart, især hvor phospholipasen er opnået fra pancreas i nævnte pattedyreart, og mest fortrinsvis hvor phospholipasen er opnået fra pancreas fra et svin.

25

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er phospholipasen fortrinsvis opnået fra en mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gær eller en bakterie.

30

Når trådsvampen, der er nævnt ovenfor, er en art af slægten *Fusarium*, er foretrukne stammer fortrinsvis stammer, såsom en stamme af *Fusarium culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *F. oxysporum*.

35

Endvidere er foretrukne stammer, når nævnte trådsvamp ovenfor er en art af slægten *Aspergillus*, stammer, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især

Aspergillus oryzae.

5 Endvidere er spiseolien i en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen fortrinsvis en sojabønneolie, solsikkefrøolie eller mere fortrinsvis en raspfrøolie.

Karakterisering af phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

10 En phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*, er blevet grundigt karakteriseret.

15 Følgelig er et aspekt af opfindelsen fortrinsvis en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis her phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-7, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3,5-6, målt ved 40 °C, og endnu mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 4,5-5,5, målt ved 40 °C.

20 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat i et NEFA test bases assay eller i en buffer omfattende 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer.

25 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 5 kDa, endnu mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 3 kDa og mest fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 2 kDa.

Molekylemassen måles ved hjælp af SDS-PAGE-elektroforese som yderligere beskrevet i "Materialer og metoder"-afsnittet (se nedenfor).

35 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8, mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt

(pI) i intervallet 5-7,5 og endnu mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 5,5-7,5.

5 Det isoelektriske punkt (pI) blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

10 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; mere fortrinsvis i intervallet 30-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; og endnu mere fortrinsvis i intervallet 40-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5.

15 Temperaturoptimummet for phospholipase-aktivitet blev målt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved pH 5. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

20 I endnu en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 7-11,5 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 8-11 ved 37 °C, og endnu mere fortrinsvis i pH-intervallet 8,5-11 ved 37 °C.

25 pH-optimummet for phospholipase-aktivitet blev bestemt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved 37 °C. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen omfatter fortrinsvis mindst to ud af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst tre af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, endnu mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst fire af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, og
35 mest fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen alle fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet.

Som beskrevet ovenfor er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet klonet, udtrykt rekombinant og oprenset, og de N-terminale og C-terminale sekvenser af det aktive secernerede enzym er blevet bestemt.

5

Følgelig angår en yderligere udførelsesform for opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, idet polypeptidet er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

10

i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,

ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,

15

iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,

iv) et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller

20

v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C,

og yderligere omfatter en aminosyresekvens, der er valgt fra gruppen, som omfatter:

25

(a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

30

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

35

(d) en analog til polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c), som er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

(e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

5 I en udførelsesform for opfindelsen er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

10 I en yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A2-aktivitet, og i en endnu yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen en phospholipase med phospholipase B-aktivitet.

15 Fortrinsvis er nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

For specifikke eksempler på standardteknikker til måling af individuel PLA1-, PLA2- og/eller PLB-aktivitet henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, målt som relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som måler frigørelse af frie fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5,
25 der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor den forholdsmæssige andel af phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er mere end 0,25, mere fortrinsvis mere end 0,5 og mest fortrinsvis mere end 0,80.

30 For yderligere detaljer vedrørende måling af afhængigheden for enzymaktiviteten af Ca^{2+} -koncentrationen henvises til forsøgseksempler heri.

35 Nogle lipaser kan have begrænset phospholipase-aktivitet. I den aktuelle forbindelse defineres en sådan begrænset phospholipase-aktivitet for nævnte lipaser som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet" (se afsnittet "Definitioner" heri). Den foreliggende opfindelse angår et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet, hvor phospholipase-aktiviteten for nævnte

isolerede polypeptid er så høj, at det har industriel relevans.

5 Følgeligt angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase med phospholipase-aktivitet, som er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:

10 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overflade af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroformopløsning,

15 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle,

20 c. en bufferopløsning (som ovenfor) indeholdende 60 µg enzym injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet",

25 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, æstimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) af DDPC.

30 Se afsnittet "Definitioner" og forsøgseksempler heri for yderligere beskrivelser af foretrukne mængder af phospholipase-aktiviteter for et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen.

35 Endvidere kan den specifikke phospholipase-aktivitet for en phospholipase ifølge opfindelsen måles ved hjælp af kendte standardassays for phospholipase-aktivitet.

Følgeligt angår den foreliggende opfindelse i en yderligere udførelsesform et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor

phospholipasen er en phospholipase, som har en phospholipase-aktivitet, der er i stand til at frigøre mindst 7 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst 15 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, endnu mere fortrinsvis mindst 30 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym og mest fortrinsvis mindst 50 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

phospholipase-aktivitet måles i et assay, der måler frigørelse af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, der omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

For yderligere detaljer vedrørende denne udførelsesform for opfindelsen henvises til forsøgseksemplerne heri.

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er meget egnet til udførelse af enzymatisk degummering af en spiseolie.

Følgeligt angår opfindelsen:

1. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie, ifølge en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

2. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm), hvorved phosphorindholdet i olien reduceres til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som emulgeres i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

Det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er fortrinsvis i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummerede spiseolie (som defineret umiddelbart ovenfor) på mindre

end 1,5 timer og anvender mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie.

5 Et isoleret polypeptid, som fremviser phospholipase-aktivitet og har egenskaberne, der er vist ovenfor, ifølge opfindelsen opnås fortrinsvis fra en trådsvampestamme fra slægten *Fusarium*.

10 Uden at være begrænset af nogen teori forventes det imidlertid på nuværende tidspunkt, at en phospholipase ifølge opfindelsen også kan opnås fra en anden mikroorganisme, fortrinsvis en anden trådsvampestamme. Eksempler derpå er givet i afsnittet "Mikrobielle kilder" (se nedenfor).

Klonet DNA-sekvens

15 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se afsnittet "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klonе en phospholipase, der fremviser PLA-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, nærmere bestemt *Fusarium oxysporum*.

20 Endvidere mener man på nuværende tidspunkt, at det er muligt at klonе både en beslægtet phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning.

25 Følgeligt vedrører et aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

30 (a) den phospholipase A-kodende del af polynukleotidet, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

(b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1 eller den komplementære streng dertil,

35 (c) en DNA-sekvens, som er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),

5 (d) en DNA-sekvens som defineret i (a) eller (b), som koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

10 (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, ved lav stringens,

15 (f) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid med aminosyresekvenserne som resterne 1 til 346, 31 til 346 eller 31 til 303 i SEQ ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

(g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specificeret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).

20 I denne specifikation påtænkes en henvisning, når en sådan gøres til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299, også at indbefatte den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1.

25 Følgelig kan udtrykkene "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299" og "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1" bruges vilkårligt.

30 DNA-sekvensen kan være af genomisk, cDNA eller syntetisk oprindelse eller en hvilken som helst kombination deraf.

35 Den foreliggende opfindelse omfatter også en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet og har aminosyresekvensen, der er vist som den modne del i SEQ ID NO: 2, som adskiller sig fra SEQ ID NO: 1 som følge af degenereringen af den genetiske kode.

5 DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, og/eller en analog sekvens ifølge opfindelsen kan klones fra en stamme af trådvampen *Fusarium oxysporum*, som danner enzymet med phospholipase-aktivitet, eller en anden eller beslægtet organisme som yderligere beskrevet nedenfor (se afsnittet "Mikrobielle kilder").

10 Alternativt kan den analoge sekvens konstrueres på basis af DNA-sekvensen, der er vist som den phospholipase-kodende del af SEQ ID NO: 1, den kan for eksempel være et udsnit deraf og/eller konstrueres ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som ikke giver anledning til en anden aminosyresekvens for phospholipasen, der kodes af DNA-sekvensen, men svarer til kodonanvendelsen for værtsorganismen, som påtænkes til
15 produktion af enzymet, eller ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som kan give anledning til en anden aminosyresekvens (det vil sige en variant til phospholipasen ifølge opfindelsen).

20 Når der udføres nukleotidsubstitutioner, er aminosyre-ændringerne fortrinsvis af en mindre betydende type, det vil sig konservative aminosyresubstitutioner, som ikke i betydelig grad påvirker proteinets foldning eller aktivitet; små deletioner, typisk af en til ca. 30 aminosyrer; små amino- eller carboxylterminale forlængelser, såsom en aminoterminal methioninrest; et lille linkerpeptid på op til ca. 20-25 rester; eller en lille forlængelse, som letter oprensningen, såsom et polyhistidin-område; en antigen epitop eller et
25 bindingsdomæne.

30 Eksempler på konservative substitutioner er inden for gruppen af basiske aminosyrer, såsom arginin, lysin, histidin; sure aminosyrer, såsom glutaminsyre og asparaginsyre, polære aminosyrer, såsom glutamin og asparagin, hydrofobe aminosyrer, såsom leucin, isoleucin, valin, aromatiske aminosyrer, såsom phenylalanin, tryptofan, tyrosin, og små aminosyrer, såsom glycin, alanin, serin, threonin, methionin. For en generel beskrivelse af nukleotidsubstitution, se for eksempel Ford et al. (1991), Protein Expression and Purification 2:95-107.

35 Det vil være klart for fagfolk, at sådanne substitutioner kan foretages uden for de områder, der er kritiske for molekylets funktion, og stadig resultere i et aktivt

polypeptid. Aminosyrer, der er essentielle for aktiviteten af polypeptidet, som kodes af den klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen og derfor fortrinsvis ikke har været genstand for substitution, kan identificeres i overensstemmelse med kendte procedurer, såsom sekvensstyret mutagenese eller alanin-scanningsmutagenese (cf. for eksempel Cunningham and Wells (1989), Science 244:1081-1085). I sidstnævnte teknik indføres mutationer i hver rest i

5 molekylet, og de resulterende mutante molekyler testes for biologisk (for eksempel phospholipase-) aktivitet til identificering af aminosyrerester, der er kritiske for molekylets aktivitet. Sites for substrat-enzym-interaktion kan også

10 bestemmes ved hjælp af en analyse af krystalstrukturen, der bestemmes ved hjælp af teknikker, såsom nuklear magnetisk resonans-analyses, krystallografi eller fotoaffinitetsmærkning (cf. for eksempel de Vos et al. (1992), Science 255:306-312; Smith et al. (1992), J. Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al. (1992), FEBS Lett. 309:59-64).

15 Polypeptider ifølge den foreliggende opfindelse indbefatter også fusionerede polypeptider eller spaltbare fusionspolypeptider, hvori et andet polypeptid er fusioneret i N-terminalen eller C-terminalen af polypeptidet eller et fragment deraf. Et fusioneret polypeptid dannes ved hjælp af fusion af en

20 nukleinsyresekvens (eller en del deraf), som koder for et andet polypeptid, til en nukleinsyresekvens (eller en del deraf) ifølge den foreliggende opfindelse. Teknikker til frembringelse af fusionerede polypeptider er kendte og indbefatter ligering af de kodende sekvenser, som koder for polypeptiderne, således at de er i læseramme, og således at ekspresion af det fusionerede polypeptid er

25 under kontrol af den samme promotor(er) og terminator.

DNA-sekvensen ifølge opfindelsen kan klones fra stammen *Escherichia coli* DSM 11299 ved anvendelse af standard-kloningsteknikker, for eksempel som beskrevet af Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

30 Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.

Da den foreliggende opfindelse har løst problemet med udvikling af et egnet screeningsassay til anvendelse i en ekspressionskloningsteknik til kloning af en phospholipase ifølge opfindelse, se afsnittet med overskriften "Metode til

35 kloning af en trådsvampe-phospholipase", kan DNA-sekvensen ifølge opfindelsen nu klones ved hjælp af en hvilken som helst generel metode, som inddrager:

- kloning i egnede vektorer af et cDNA-bibliotek fra en hvilken som helst organisme, der forventes at danne phospholipasen af interesse,

5

- transformation af egnede gærværtsceller med nævnte vektorer,

- dyrkning af værtscellerne under passende betingelser til ekspression af et hvilket som helst enzym af interesse, der kodes af en klon i cDNA-biblioteket,

10

- screening for positive kloner ved hjælp af bestemmelse af eventuel phospholipase-aktivitet hos enzymet, der dannes af sådanne kloner, og

- isolering af det enzymkodende DNA fra sådanne kloner.

15

Alternativt kan DNA'et, der koder for en phospholipase ifølge opfindelsen, da den foreliggende opfindelse for første gang tilvejebringer en klonet DNA-sekvens, som koder for et trådsvampe-PLA-enzym, i overensstemmelse med velkendte procedurer klones traditionelt fra en egnet kilde, såsom en hvilken

20 som helst af organismene, der er nævnt i afsnittet "Mikrobielle kilder", ved anvendelse af syntetiske oligonukleotidprober, der er fremstillet på basis af en DNA-sekvens, der er beskrevet heri. For eksempel kan en egnet oligonukleotidprobe fremstilles på basis af den phospholipase-kodende del af nukleotidsekvenserne, der er vist i SEQ ID NO: 1, eller et hvilket som helst

25 egnet udsnit deraf eller på basis af aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.

Da endvidere en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, er en række af de specifikke udførelsesformer, som vedrører et isoleret polypeptid med

30 phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, også udførelsesformer for opfindelsen for en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet. Følgelig vedrører referencer og foretrukne og mest foretrukne udførelsesformer for nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet også en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen.

35

Som følge deraf vedrører en udførelsesform for opfindelsen en klonet DNA-

sekvens ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A1.

5 I en yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A2, og i en endnu yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase B.

10 Fortrinsvis koder for nævnte klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen et polypeptid med phospholipase A1-aktivitet.
Endvidere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, der måles som:

15 - relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som måler frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er et forhold, der er større end 0,25, mere fortrinsvis et forhold, der er større end 0,5.

25 Endnu yderligere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, der er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:

30 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overfalde af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroform-opløsning,

35 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for

DDPC på ca. 63 \AA^2 /molekyle,

5 c. en bufferopløsning (som ovenfor), der indeholder $60 \mu\text{g}$ enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm^2 og et volumen på 30400 mm^3) i "nul ordens-niveauet",

10 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget til opretholdelse af konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, æstimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

15 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelse, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, som er i stand til at frigøre mindst $7 \mu\text{mol}$ fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst $15 \mu\text{mol}$ fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

20 phospholipase-aktivitet måles i et assay, der måler frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37°C , efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95°C i 5 minutter.

25 I yderligere udførelsesformer angår opfindelsen:

30 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie i overensstemmelse med en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

35 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummet spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm) og derved reducere phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte

olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

- 5 En klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen er fortrinsvis en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummede spiseolie ved anvendelse af mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvorved phospholipasen er i kontakt med
- 10 nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

Fremgangsmåde til kloning af en trådsvampe-phospholipase

- 15 Man stødte på en række tekniske vanskeligheder, da man forsøgte at isolere en phospholipase ifølge opfindelsen eller klonet et polynukleotid, som kodede for den. Det syntes umuligt at isolere enzymet, og problemet med kloning af polynukleotidet blev forfulgt.

- 20 Som beskrevet heri var der ingen kendt DNA-sekvens, som kodede en trådsvampe-phospholipase A, tilgængelig. Følgelig udviklede de foreliggende opfindere en kloningsstrategi på basis af ekspressionskloning-i-gær-teknikken (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953).

- 25 Ét af de største problemer i forbindelse med denne teknik var, at gær danner en indre aktivitet, som giver anledning til en phospholipase-baggrund i udpladningsassays. Denne baggrund viste sig at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres omhyggeligt til et niveau, hvor baggrunden var lav nok, til at assayet
- 30 kunne være pålideligt under ekspressionsklonings-screeningsproceduren, men høj nok til at reaktionen kan finde sted.

- Ydermere omfatter trådsvampepestammer almindeligvis en række forskellige lipaser, hvoraf nogle endog fremviser begrænset phospholipase-aktivitet.
- 35 Sådanne lipaser defineres heri som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet (se afsnittet "Definitioner" heri).

I udpladningsassayet viste baggrunden af sådanne lipaser med phospholipase-sideaktivitet sig også at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres endnu mere omhyggeligt for at eliminere baggrundsaktiviteten fra både gærcellerne og trådsvampelipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

Ud over dette viste det sig, at der skulle foretages et omhyggeligt valg af substrat, da mange ikke tilvejebragte nogen funktionel løsning på problemet, fordi en række af de testede phospholipase-substrater gav en baggrundsaktivitet, som skyldtes, at lipaser uden phospholipase-aktivitet var i stand til at reagere på substraterne. Følgelig skulle et stort antal substrater testes og titreres for at identificere et egnet substrat.

Den fundne løsning til muliggørelse af udførelse af ekspressionskloneringen af et phospholipase-kodende polynukleotid var anvendelse af Lipoid E80 (fra Lipoid GmbH) i omhyggeligt målte koncentrationer. I "Materiale og metode"-afsnittet heri findes en detaljeret beskrivelse af den komplette ekspressionskloning-i-gær-metode, herunder et udpladningsassay, som løser de ovenfor beskrevne problemer.

Homologi/lighed for DNA-sekvenser

DNA-sekvenshomologien/ligheden, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens fra den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 5,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,3, fremviser det kodende område af DNA-sekvensen en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, mere fortrinsvis mindst 97 % med den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1 (det vil sige position 23-1063 i SEQ ID NO: 1), eller mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 113-

1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

5

Hybridisering

Hybridiseringen, der henvises til ovenfor, påtænkes at omfatte en analog DNA-sekvens, som hybridiserer til en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1063, eller mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 113-1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i det C-terminalt processerede secernerede aktive enzym) under i det mindste lave stringens-betingelser som beskrevet detaljeret nedenfor.

Egnede forsøgsbetingelser til bestemmelse af hybridisering ved lav, medium eller høj stringens mellem en nukleotidprobe og en homolog DNA- eller RNA-sekvens inddrager forudgående udblødning af filteret, der indeholder DNA-fragmenterne eller RNA'et, der skal hybridisere, i 5 x SSC (natriumchlorid/natriumcitrat, Sambrook et al., 1989) i 10 minutter og præhybridisering af filteret i en opløsning af 5 x SSC, 5 x Denhardt's opløsning (Sambrook et al., 1989), 0,5 % SDS og 100 µg/ml denatureret sonikeret laksesperma-DNA (Sambrook et al., 1989), efterfulgt af hybridisering i den samme opløsning, som indeholder 10 ng/ml af en vilkårlig primet (Feinberg, A.P., og Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13), ³²P-dCTP-mærket (specifik aktivitet > 1 x 10⁹ cpm/µg) probe i 12 timer ved ca. 45 °C. Filteret vaskes herefter to gange i 30 minutter i 2 x SSC, 0,5 % SDS ved en temperatur på mindst 55 °C (lav stringens), mere fortrinsvis mindst 60 °C (medium stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 65 °C (medium/høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 70 °C (høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 75 °C (meget høj stringens).

Molekyler, hvortil oligonukleotidproben hybridiserer under disse betingelser,

påvises ved anvendelse af en X-røntgenfilm.

Det har vist sig, at det er muligt teoretisk at forudsige om to givne DNA-sekvenser vil hybridisere under bestemte specifikke betingelser.

5

Følgeligt kan forsøgsmetoden som et alternativ til den overfor beskrevne til bestemmelse af, om en analog DNA-sekvens vil hybridisere til nukleotidproben, baseres på en teoretisk beregning af den T_m (smeltetemperatur), hvorved to heterologe DNA-sekvenser med kendte sekvenser vil hybridisere under specificerede betingelser (for eksempel med hensyn til kation-koncentration og temperatur).

10

For at bestemme smeltetemperaturen for heterologe DNA-sekvenser ($T_m(\text{hetero})$) er det nødvendigt indledningsvis at bestemme smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for homologe DNA-sekvenser.

15

Smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for to helt komplementære DNA-strengte (homodupleksdannelse) kan bestemmes ved anvendelse af følgende formel:

20

$$T_m(\text{homo}) = 81,5^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ form}) - (500/L)$$

("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), hvor:

"M" = den molære kation-koncentration i vaskebuffer,

"% GC" = % Guanin (G) og Cytosin (C) af det totale antal baser i DNA-sekvensen.

25

"% form" = % formamid i vaskebufferen, og

"L" = længden af DNA-sekvensen.

30

Ved anvendelse af denne formel og de eksperimentelle vaskebetingelserne, der er angivet ovenfor, er $T_m(\text{homo})$ for homodupleksdannelsen for nukleotidproben, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1060:

$$T_m(\text{homo}) = 81,5 + 16,6(\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$$

$$T_m(\text{homo}) = 103,5^\circ\text{C}.$$

35

"M": 2 x SSC svarer til en kation-koncentration på 0,3 M,

"% GC": % GC i SEQ ID NO: 1, position 23-1060 er 56 %.

"% form": Der er intet formamid i vaskebufferen.

"L": Længden af SEQ ID NO: 1, position 23-1063 er 1038 bp.

5 T_m bestemt ved hjælp af ovennævnte formel er T_m for en homodupleksdannelse (T_m(homo)) mellem to helt komplementære DNA-sekvenser. For at tilpasse T_m-værdien til en for to heterologe DNA-sekvenser, antager man, at en 1 % forskel i nukleotidsekvensen mellem de to heterologe sekvenser svarer til et fald på 1 °C i T_m ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995). T_m(hetero) for heterodupleksdannelsen findes derfor ved at trække homologi-%-forskellen mellem den analoge sekvens, det drejer sig om, og nukleotidproben, der er beskrevet ovenfor, fra T_m(homo). DNA-homologiprocenten, som skal trækkes fra, beregnes som beskrevet heri (se nedenfor).

Homologi med aminosyresekvenser

15 Polypeptidhomologien, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens for den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 3,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,1, fremviser den modne del af et polypeptid, der kodes af en analog DNA-sekvens, en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, især mindst 97 % med den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, det vil sige position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis med aminosyresekvensen, der er vist i position 31-303 i SEQ ID NO: 2 (position 303 er den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

35 Den foreliggende opfindelse er også rettet mod phospholipase-varianter med en aminosyresekvens, der adskiller sig i ikke mere end tre aminosyrer, fortrinsvis i ikke mere end to aminosyrer og mere fortrinsvis i ikke mere end en aminosyre fra den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID

NO: 2.

5 Endvidere angår de ovennævnte foretrukne aminosyreligheder også en analog til en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, idet denne sekvens koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet, og som er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der omfatter positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2.

10 Immunologisk krydsreaktivitet

Antistoffer, der skal anvendes til bestemmelse af immunologisk krydsreaktivitet, kan fremstilles ved anvendelse af en oprenset phospholipase. Mere specifikt kan der dannes antiserum mod phospholipasen ifølge opfindelsen ved hjælp af immunisering af kaniner (eller andre gnavere) i overensstemmelse med proceduren, der er beskrevet af Axelsen et al. i A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter. 23, eller A. Johnstone og R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (nærmere bestemt side 27-31). Oprensede immunoglobuliner kan opnås fra antiserumet, for eksempel ved hjælp af saltfældning $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, efterfulgt af dialyse og ionbytningskromatografi, for eksempel på DEAE-Sephadex. Immunokemisk karakterisering af proteiner kan udføres enten ved hjælp af Ouchterlony-dobbeltdiffusionsanalyse (O. Ouchterlony i: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), ved hjælp af kryds-immunelektroforese (N. Axelsen et al., supra, kapitel 3 og 4) eller ved hjælp af raket-immunelektroforese (N. Axelsen et al., kapitel 2).

30 Mikrobielle kilder

På prioriteringsdatoen for den foreliggende opfindelse er taksonomien, der anvendes nedenfor, i overensstemmelse med World Wide Web (WWW)-NCBI-taksonomi-browseren.

35

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen kan opnås fra en hvilken som helst

mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gærcele eller en bakterie.

5 Fortrinsvis kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme, hvor en foretrukken række er *Ascomycota*, hvor en foretrukken klasse er *Pyrenomycetes*, som omfatter den foretrukne familie *Nectriaceae*.

10 Mere fortrinsvis kan phospholipasen og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum* eller *F. solani*, især en stamme af *Fusarium oxysporum*.

15 Endvidere kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme fra slægten *Aspergillus*, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især *Aspergillus oryzae*.

20 Et isolat fra en stamme af *Fusarium oxysporum*, hvorfra en phospholipase ifølge opfindelsen kan opnås, er blevet deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

25 Deponeringsdato: 6. juni 1983
Deponents ref.: NNO41759
DSM-nr.: *Fusarium oxysporum* DSM-nr. 2672

30 Endvidere er ekspressionsplasmidet pYES 2.0, som omfatter den udforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, blevet transformeret ind i en stamme af *Escherichia coli*, som blev deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
35 Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

Deponeringsdato: 25. november 1996

Deponents ref.: NNO49279
DSM-nr.: *Escherichia coli* DSM-nr. 11299

Ekspressionsvektorer

5

Ekspressionsvektoren ifølge opfindelsen kan være en hvilken som helst ekspressionsvektor, som på bekvem vis kan udsættes for rekombinant-DNA-procedurer, og valget af vektor vil ofte afhænge af værtscellen, hvori vektoren skal indføres. Vektoren kan således være en autonomt replikerende vektor, 10 det vil sige en vektor, der findes som en ekstrakromosomal enhed, hvis replikation er uafhængig af kromosomal replikation, for eksempel et plasmid. Alternativt kan vektoren være en, der, når den indføres i en værtcelle, integreres i værtscellegenomet og replikeres sammen med kromosomet eller kromosomeme, hvori den er integreret.

15

I ekspressionsvektoren skal DNA-sekvensen, der koder for phospholipasen, være operationelt koblet til en egnet promotor- eller terminatorsekvens. Promotoren kan være en hvilken som helst DNA-sekvens, der fremviser transkriptionel aktivitet i den valgte værtscelle, og kan stamme fra gener, der 20 koder for proteiner, som enten er homologe eller heterologe for værtscellen. Procedurene, som anvendes til ligering af DNA-sekvenserne, der koder for phospholipasen, promotoren og terminatoren, og til insertion af disse i egnede vektorer er velkendte (cf. for eksempel Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

25

Eksempler på egnede promotorer til anvendelse i trådsvampeværtsceller er for eksempel ADH3-promotoren (McKnight et al., The EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) eller tpiA-promotoren. Eksempler på andre anvendelige promotorer er de, der stammer fra genet, der koder for *Aspergillus oryzae*-TAKA-amylase, 30 *Rhizomucor miehei*-asparagin-proteinase, *Aspergillus niger*-neutral α -amylase, *Aspergillus niger*-syrestabil α -amylase, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus awamori*-glucoamylase (gluA), *Rhizomucor miehei*-lipase, *Aspergillus oryzae*-alkalisk protease, *Aspergillus oryzae*-triosephosphat-isomerase eller *Aspergillus nidulans*-acetamidase.

35

Værtsceller

5 Den foreliggende opfindelse angår også rekombinante værtsceller, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, hvor cellerne med fordel kan anvendes i den rekombinante produktion af polypeptiderne. Udtrykket "værtscelle" omfatter et hvilket som helst afkom af en parentalcelle, som ikke er identisk med parentalcellen på grund af mutationer, der forekommer under replikation.

10 Cellen transformeres fortrinsvis med en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, efterfulgt af integrering af vektoren i værtskromosomet.

15 "Transformation" betyder indførelse af en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge den foreliggende opfindelse i en værtscelle, således at vektoren opretholdes som en kromosomalt integreret sekvens eller som en selvreplicerende ekstrakromosomal vektor. Integrering anses almindeligvis for at være en fordel, da det er mere sandsynligt, at nukleinsyresekvensen opretholdes stabilt i cellen. Integrering af vektoren i værtskromosomet kan
20 forekomme ved hjælp af homolog eller ikke-homolog rekombination som beskrevet ovenfor.

I en foretrukken udførelsesform er værtscellen en svampecelle. "Svampe" indbefatter som anvendt heri rækken *Ascomycota*, *Basidiomycota*,
25 *Chytridiomycota* og *Zygomycota* (som defineret af Hawksworth et al., I: Ainsworth og Bisby's Dictionary of The Fungi, 8. udgave, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) såvel som *Oomycota* (som anført i Hawksworth et al., 1995, supra, page 171) og alle mitosporiske svampe (Hawksworth et al., 1995, supra). Repræsentative grupper af
30 *Ascomycota* indbefatter for eksempel *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) og de egentlige gær, der er anført ovenfor. Eksempler på *Basidiomycota* indbefatter paddehatte, rust og brand. Repræsentative grupper af *Chytridiomycota* indbefatter for eksempel *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* og
35 akvatiske svampe. Repræsentative grupper af *Oomycota* indbefatter for eksempel saprolegniomycetøse akvatiske svampe (vandskimmelsvampe), såsom *Achlya*. Eksempler på mitosporiske svampe indbefatter *Aspergillus*,

Penicillium, *Candida* og *Alternaria*. Repræsentative grupper af Zygomycota indbefatter for eksempel *Rhizopus* og *Mucor*.

I en foretrukken udførelsesform er svampeværtscelle en trådsvampecelle. "Trådsvampe" indbefatter alle trådagtige former af undergruppen *Eumycota* og *Oomycota* (som defineret af Hawksworth et al., 1995, supra). Trådsvampe er kendetegnet ved et vegetativt mycelium, der består af chitin, cellulose, glucan, chitosan, mannan og andre komplekse polysaccharider. Vegetativ vækst sker ved hyfal forlængelse, og carbonkatabolismen er obligat aerob. I modsætning hertil sker vegetativ vækst hos gær, såsom *Saccharomyces cerevisiae*, ved hjælp af knopskydning fra en unicellulær thallus, og carbonkatabolismen kan være fermentativ. I en mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en celle fra en art af men ikke begrænset til *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* og *Trichoderma* eller en teleomorf eller et synonym dertil. I en endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Acremonium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Mucor*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Tolypocladium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Trichoderma*-celle. I en mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus awamori*-, *Aspergillus foetidus*-, *Aspergillus japonicus*-, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus oryzae*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle fra gruppen *Discolor* (også kendt som gruppen *Fusarium*). I en anden foretrukken udførelsesform er trådsvampeparentalcellen en *Fusarium*-stamme fra udsnittet *Elegans*, for eksempel *Fusarium oxysporum*. I en anden

mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola insolens*- eller *Thermomyces lanuginosa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Rhizomucor miehei*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora thermophilum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora crassa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium purpurogenum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia terrestris*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er *Trichoderma*-cellen en *Trichoderma harzianum*-, *Trichoderma koningii*-, *Trichoderma longibrachiatum*-, *Trichoderma reesei*- eller *Trichoderma viride*-celle.

Svampeceller kan transformeres ved hjælp af en proces, der inddrager protoplast-dannelse, transformation af protoplasterne og regenerering af cellevæggen på en måde, der er kendt per se. Egnede procedurer til transformation af *Aspergillus*-værtsceller er beskrevet i EP 238 023 og Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474. En egnet fremgangsmåde til transformation af *Fusarium*-arter er beskrevet af Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156 eller i sideløbende US serienr. 08/269 449. Gær kan transformeres ved anvendelse af procedurene, der er beskrevet af Becker og Guarente, i: Abelson, J.N., og Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology 194:182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; og Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920. Mammaliaceller kan transformeres ved hjælp af direkte optagelse ved anvendelse af calciumphosphat-fældningsmetoden ifølge Graham og Van der Eb (1978, Virology 52:546).

Fremgangsmåde til frembringelse af phospholipase

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til frembringelse af et isoleret enzym ifølge opfindelsen, hvorved en egnet værtscelle, som er blevet transformeret med en DNA-sekvens, der koder for enzymet, dyrkes under betingelser, der åbner mulighed for dannelsen af enzymet, og det resulterende enzym indvindes fra kulturen.

Når en ekspressionsvektor, der omfatter en DNA-sekvens, som koder for enzymet, transformeres ind i en heterolog værtscelle, er det muligt at åbne mulighed for heterolog rekombinant produktion af enzymet ifølge opfindelsen.

- 5 Derved er det muligt at opnå en stærkt oprenset phospholipase-sammensætning, som er kendetegnet ved at være fri for homologe urenheder.

I den foreliggende opfindelse kan den homologe værtscelle være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

10

Mediet, som anvendes til at dyrke de transformerede værtsceller, kan være et hvilket som helst traditionelt medium, som er egnet til dyrkning af de pågældende værtsceller. Den udtrykte phospholipase kan passende secerneret ud i dyrkningsmediet og indvindes derfra ved hjælp af velkendte procedurer, herunder separering af cellerne fra mediet ved hjælp af centrifugering eller filtrering, fældning af proteinagtige bestanddele i mediet ved hjælp af et salt, såsom ammoniumsulphat, efterfulgt af kromatografiske procedurer, såsom ionbytningskromatografi, affinitetskromatografi eller lignende.

15

20

Anvendelse af phospholipase

- 25 Foruden anvendelsen af en phospholipase i en ny fremgangsmåde ifølge opfindelse til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbart phosphor, er en række andre anvendelser af phospholipaser kendte.

Sådanne kendte anvendelser af phospholipaser er beskrevet nedenfor.

- 30 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i en hvilken som helst anvendelse, hvor det ønskes at hydrolysere fedtsyregruppen eller grupperne i et phospholipid eller lysophospholipid, såsom lecithin eller lysolecithin. Phospholipasen anvendes fortrinsvis ved pH 3-10 og ved 30-70 °C (især 40-60 °C). Hvis det ønskes, kan phospholipasen inaktiveres efter reaktionen ved at udsætte den for varmebehandling, for eksempel ved pH 7, 80 °C i 1 time eller 90 °C i 10 minutter.

35

- 5 Som eksempel kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i fremstillingen af dej, brød og kager, for eksempel til at forbedre brødets eller kagens elasticitet. Phospholipasen kan således anvendes i en proces til frembringelse af brød, som omfatter tilsætning af phospholipasen til bestanddelene i en dej, æltning af dejen og bagning af dejen til frembringelse af brød. Dette kan udføres analogt med US 4 567 046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) eller EP 426211 (Unilever).
- 10 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan også anvendes til at forbedre filtrerbarheden af en vandig opløsning eller opslemning af carbohydrat-oprindelse ved hjælp af behandling af den med phospholipasen. Dette er særligt anvendeligt til en opløsning eller opslemning, som indeholder et stivelseshydrolysat, især et hvedestivelseshydrolysat, da denne har en
- 15 tendens til at være vanskelig at filtrere og at give uklare filtrater. Behandlingen kan udføres analogt med EP 219 269 (CPC International).
- 20 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes til partiel hydrolyse af phospholipider, fortrinsvis lecithin, til opnåelse af forbedrede phospholipid-emulgeringsmidler. Denne anvendelse beskrives yderligere i produktark til Lecitase™ (Novo Nordisk A/S), som angår brugen deraf, og i Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Udgiver: VCH Weinheim (1996)).
- 25 Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes i en proces til produktion af et dyrefoder, som omfatter blanding af phospholipasen med foderstoffer og mindst ét phospholipid. Dette kan gøres analogt med EP 743 017.
- 30 Degummering af plante-/spiseolier i overensstemmelse med kendte procedurer
- 35 I overensstemmelse med kendte procedurer kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, som omfatter behandling af olien med phospholipasen til hydrolysering af hovedparten af phospholipiden og separering af en vandig fase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid fra olien. Denne proces

er anvendelig til oprensning af en hvilken som helst spiseolie, der indeholder phospholipid, for eksempel planteolie, såsom sojabønneolie, rapsfrøolie og solsikkeolie.

- 5 Føør den enzymatiske behandling forbehandles planteolien fortrinsvis til fjernelse af slim (mucilago), for eksempel ved hjælp af vådraffineri. Olien vil typisk indeholde 50-250 ppm phosphor som phospholipid ved starten af behandlingen med phospholipase, og processen ifølge opfindelsen kan reducere denne værdi til under 11 ppm, mere fortrinsvis under 5 ppm.
- 10 Den enzymatiske behandling udføres ved hjælp af dispersion af en vandig opløsning af en phospholipase, fortrinsvis som små dråber med en gennemsnitlig diameter på under 10 µm. Mængden af vand er fortrinsvis 0,5-5 vægt-% i forhold til olien. Et emulgeringsmiddel kan eventuelt tilsættes.
- 15 Mekanisk bevægelse kan anvendes til opretholdelse af emulsionen.
- Den enzymatiske behandling kan udføres ved et hvilket som helst pH i intervallet 1,5-8. pH kan justeres ved hjælp af tilsætning af citronsyre, en citratbuffer eller HCl.
- 20 En passende temperatur er almindeligvis 30-70 °C (især 40-60 °C). Reaktionsiden vil typisk være 0,5-12 timer (for eksempel 2-6 timer), og en passende enzymdosis vil sædvanligvis være 100-5000 IU pr. liter olie, især 200-2000 IU/l.
- 25 Den enzymatiske behandling kan udføres batchvis, for eksempel i en tank med omrøring, eller kan være fortløbende, for eksempel i en serie af omrørte reaktortanke.
- 30 Den enzymatiske behandling følges af separering af en vandfase og en oliefase. Denne separering kan udføres ved hjælp af traditionelle midler, for eksempel centrifugering.
- 35 I andre henseender kan processen udføres i overensstemmelse med kendte principper, for eksempel analogt med US 5 264 367 (Metallgesellschaft, Röhmi); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM 6(12):1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol. 95(8):300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); eller

EP 654 527 (Metalgesellschaft, Röhm).

Anvendelse af en phospholipase ifølge opfindelsen til bagning

5 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i brød-forbedrende additiver, for eksempel dejsammensætninger, dejadditiver, dejkonditioneringsmidler, færdigblandinger og tilsvarende præparater, som traditionelt tilsættes til melet og/eller dejen i løbet af processer til frembringelse af brød eller andre bagte produkter til tilvejebringelse af forbedrede egenskaber for brød eller andre bagte produkter.

10 En udførelsesform for opfindelsen angår derfor en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning og endvidere anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen i sådanne sammensætninger og en dej eller et bagt produkt, som omfatter en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen.

15 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykkene "brødforbedrende sammensætning" og "dejforbedrende sammensætning" at angive sammensætninger, som foruden enzybestanddelen kan omfatte andre stoffer, som traditionelt anvendes til bagning til forbedring af dejens og/eller de bagte produkters egenskaber. Eksempler på sådanne bestanddele er anført nedenfor.

20 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "forbedrede egenskaber" at angive en hvilken som helst egenskab, der kan forbedres ved hjælp af virkningen af et phospholipase-enzym ifølge opfindelsen. Især resulterer anvendelsen af phospholipase i et forøget volumen og en forbedret krummestruktur og anti-"friskhedstab"-egenskaber hos det bagte produkt, såvel som en forøget styrke, stabilitet og reduceret klæbetilbøjelighed og derved forbedret maskinbearbejdelse hos dejen. Effekten på dejen har vist sig at være særlig god, når der anvendes en mel af ringe kvalitet. Den forbedrede maskinbearbejdelse har særlig betydning i forbindelse med dej, der skal bearbejdes industrielt.

35 De forbedrede egenskaber vurderes ved hjælp af sammenligning med dej og/eller bagte produkter, der er fremstillet uden tilsætning af phospholipase

ifølge den foreliggende opfindelse.

- 5 Den brød- og/eller dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen kan yderligere omfatte et andet enzym. Eksempler på andre enzymer en cellulase, en hemicellulase, en pentosanase (der er anvendelig til partiel hydrolyse af pentosaner, som øger dejens udvidelsesevne), en glucoseoxidase (der er anvendelig til at gøre dejen stærkere), en lipase (der er anvendelig til modificering af lipider, der er til stede i dejen eller dejbestanddele til blødgøring af dejen), en peroxidase (der er anvendelig til forbedring af dejkonsistensen),
- 10 en protease (der er anvendelse til glutensvækkelse, især ved anvendelse af hård hvedemel), en peptidase og/eller en amylase, for eksempel α -amylase (der er anvendelig til tilvejebringelse af sukre, der kan fermenteres ved hjælp af gær).
- 15 Endvidere eller som et alternativ til andre enzybestanddele kan den dejforbedrende og/eller brødforbedrende sammensætning omfatte et traditionelt anvendt bagemiddel, for eksempel en eller flere af følgende bestanddele:
- 20 Et mælkepulver (som tilvejebringer skorpefarve), gluten (til at forbedre svage meles gastiilbageholdelsesstyrke), et emulgeringsmiddel (til at forbedre dejens udvidelsesevne og i nogen grad konsistensen af det resulterende brød), granuleret fedt (til blødgøring af dejen og for brødets konsistens), en oxidant (som tilsættes for at forstærke glutenstrukturen, for eksempel ascorbinsyre,
- 25 kaliumbromat, kaliumiodat eller ammoniumpersulfat), en aminosyre (for eksempel cystein), en sukker og salt (for eksempel natriumchlorid, calciumacetat, natriumsulfat eller calciumsulfat, hvis funktion er at gøre dejen fastere), mel eller stivelse.
- 30 Eksempler på egnede emulgeringsmidler er mono- eller diglycerider, diacetylvinsyre-estere af mono- eller diglycerider, sukker-estere af fedtsyrer, polyglycerol-estere af fedtsyrer, mælkesyre-estere af monoglycerider, eddikesyre-estere af monoglycerider, polyoxyethylenstearater, phospholipider og lecithin.
- 35 I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "bagt produkt" at indbefatte et hvilket som helst produkt, der er fremstillet af dej, som enten har

5 en blød eller en sprød karakter. Eksempler på bagte produkter, hvad enten de er af hvid, lys eller mørk type, som med fordel kan fremstilles ved anvendelse af den foreliggende opfindelse, er brød (især hvidt brød, fuldkorns- eller rugbrød), typisk i form af hele brød eller kuvertbrød, fransk baguette-type brød, pitabrød, tacos, kager, pandekager, kiks, knækbrød og lignende.

Dejen ifølge opfindelsen kan være af en hvilken som helst af typerne, der er beskrevet ovenfor, og kan være frisk eller frosset.

10 Fra ovennævnte beskrivelse vil det fremgå, at dejen ifølge opfindelsen normalt er en surdej eller en dej, der skal symes. Dejen kan symes på forskellige måder, såsom ved hjælp af tilsætning af natriumbicarbonat eller lignende eller ved hjælp af tilsætning af en surdej (gærende dej), men det foretrækkes at syme dejen ved hjælp af tilsætning af en egnet gærkultur, såsom en kultur af
15 *Saccharomyces cerevisiae* (bagegær). En hvilken som helst af de kommercielt tilgængelige *S. cerevisiae*-stammer kan anvendes.

I en sidste udførelsesform angår opfindelsen anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen til fremstilling af pastadej, som fortrinsvis
20 fremstilles af durummel eller en mel af sammenlignelig kvalitet. Dejen kan fremstilles ved anvendelse af traditionelle teknikker og phospholipasen anvendes i en tilsvarende dosis, som den der er beskrevet ovenfor. Phospholipasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, for eksempel som beskrevet heri. Det påtænkes, at phospholipasen, når den anvendes til
25 fremstilling af pasta, resulterer i en forstærkning af glutenstrukturen og således en reduktion i dejens klæbetilbøjelighed og en forbedret dejstyrke.

Anvendelse af lipaseaktivitet hos et enzym ifølge opfindelsen

30 Som vist i forsøgseksemplerne heri kan en phospholipase ifølge opfindelsen yderligere fremvise lipaseaktivitet.

Følgeligt angår opfindelsen yderligere anvendelsen af denne lipaseaktivitet i standardanvendelser af en lipase, især til anvendelse i rengørings- og
35 detergentsammensætninger. Sådanne rengørings- og detergentsammensætninger er velbeskrevne, og der henvises til WO 96/34946, WO 97/07202 og WO 95/30011 for yderligere beskrivelser af

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

5 Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

10 Deponerede organismer

Fusarium oxysporum DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA-sekvensen ifølge opfindelsen.

15 *Escherichia coli* DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

20 Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

25 *E. coli*-stamme: DH10B (Life Technologies).

Plasmider

30 *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

35 pA2PH10 (se eksempel 7).

Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

5 Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

10 Deponerede organismer

Fusarium oxysporum DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA-sekvensen ifølge opfindelsen.

15 *Escherichia coli* DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

20 Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

25 *E. coli*-stamme: DH10B (Life Technologies).

Plasmider

30 *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

35 pA2PH10 (se eksempel 7).

Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

Den enzymaktivitet, der er nødvendig til frembringelse af 1 μ mol fedtsyre pr. minut fra enzymreaktionen, defineredes som 1 enhed.

Ekspressionskloning i gær

5

Ekspressionskloning i gær blev udført som beskrevet udførligt af H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), der medtages heri som reference.

10

Alle individuelle trin i ekstraktion af totalt RNA, cDNA-syntese, mungbønnenukleasebehandling, stump-endedannelse med T4-DNA-polymerase og konstruktion af biblioteker blev udført i overensstemmelse med referencerne, der er nævnt ovenfor.

15

Fermenteringsprocedure af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 til mRNA-isolering

20

Fusarium oxysporum DSM 2672 blev dyrket i YPD-medium i 4 dage ved 30 °C. 10 μ l supernatant blev testet for phospholipase-aktivitet i udpladningsassayet, der er beskrevet nedenfor.

mRNA blev isoleret fra mycelium fra denne kultur som beskrevet i H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953.

25

Identificering af positive gærkloner (udpladningsassay)

Identificering af positive gærkloner (det vil sige kloner, som omfatter et gen, der koder for phospholipase-aktivitet) blev udført som beskrevet nedenfor.

30

Gærtransformanterne udplades på SC-agar, der indeholder 2 % glucose, og inkuberes i 3 dage ved 30 °C. Et celluloseacetat-filter (OE67, Schleicher & Schuell) anbringes ovenpå cellerne og overføres herefter til skålene, der indeholder SC-agar og 2 % galactose med cellerne ovenpå filteret. Efter 3 dages inkubation ved 30 °C overføres filteret med celler til substratskåle.

35

Positive kloner identificeres som kolonier, der fremkalder en blågrøn zone i substratskålen under kolonien.

Substratskålene er fremstillet på følgende måde: 2,5 g agar (BA-30 INA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) tilsættes til 137,5 ml H₂O, opvarmet til kogning i en mikrobølgeovn. Efter nedkøling til ca. 60 °C tilsættes 30 ml af følgende blanding: 62,5 ml 0,4 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) og 50 ml 3 % Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Tyskland), som er opløst i 2 % Triton X-100 (volumen/volumen), og 0,5 ml 2 % Brilliant Green-opløsning i H₂O. Koncentrationen af substratet er vigtig. Hvis koncentrationen er for høj, kan det give anledning til baggrundsaktivitet fra gærceller og/eller fra trådsvampelipaser med phospholipase-sideaktivitet.

Isolering af et cDNA-gen til ekspresion i *Aspergillus*

En phospholipase-producerende gærkoloni podes i 20 ml YPD-medium i et 50 ml-glas-reagensglas. Reagensglasset rystes i 2 dage ved 30 °C. Cellerne høstes ved hjælp af centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm.

DNA isoleres ifølge WO 94/14953 og opløses i 50 ml vand. DNA'et transformeres ind i *E. coli* ved hjælp af standardprocedurer. Plasmid-DNA isoleres fra *E. coli* ved anvendelse af standardprocedurer og analyseres ved hjælp af restriktionsenzymanalyse. cDNA-insertet skæres ud ved anvendelse af passende restriktionsenzymmer og ligeres ind i en *Aspergillus*-ekspressionsvektor.

Transformation af *Aspergillus oryzae* eller *Aspergillus niger*

Protoplaster kan fremstilles som beskrevet i WO 95/02043, side 6, linie 2 - side 17, linie 12, der medtages heri som reference.

100 µl af protoplast-suspensionen blandes med 5-25 µg af det behørig DNA i 10 µl STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Protoplaster blandes med p3SR2 (et *A. nidulans*-amdS-gen-indeholdende plasmid). Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter. 0,2 ml 60 % PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, tilsættes og blandes omhyggeligt (to gange), og til sidst tilsættes 0,85 ml af den samme opløsning og blandes omhyggeligt. Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter, centrifugeres ved 2500 x g i 15 minutter, og pelleten resuspenderes i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter endnu en sedimentering spredes

- protoplasterne i minimale skåle (Cove, Biochem. Biophys. Acta (1966), 113:51-56), som indeholder 1,0 M sucrose, pH 7,0, 10 mM acetamid som nitrogen-kilde og 20 mM CsCl til hæmning af baggrundsvækst. Efter inkubation i 4-7 dage ved 37 °C udtages sporer og spredes til enkeltkolonier. Denne procedure gentages, og sporer fra en enkeltkoloni efter den anden reisolering opbevares som en defineret transformant.

Test af *Aspergillus oryzae*- eller *Aspergillus niger*-transformanter

- Hver af *Aspergillus oryzae*-transformanterne podes i 10 ml YPM (cf. nedenfor) og opformeres. Efter 2-5 dages inkubation ved 30 °C fjernes supernatanten. 20 µl supernatant påføres i huller, der er stukket i substratpladen (se ovenfor). Efter 1-24 timer viser phospholipase-aktivitet sig som en blågrøn zone omkring hullet.

15

Tilførsels-batchfermentering

- Tilførsels-batchfermentering blev udført i et medium, som omfattede maltodextrin som carbonkilde, urinstof som nitrogenkilde og gærekstrakt. Tilførsels-batchfermenteringen blev udført ved hjælp af podning af en rystekolbekultur af *A. oryzae*-værtsceller af interesse i et medium, som omfattede 3,5 % af carbonkilden og 0,5 % af nitrogenkilden. Efter 24 timers dyrkning ved pH 7,0 og 34 °C blev den fortløbende tilførsel af yderligere carbon- og nitrogenkilder indledt. Carbonkilden blev holdt som den begrænsende faktor, og det blev sikret, at der var oxygen til stede i overskydende mængder. Tilførsels-batchdyrkingen blev fortsat i 4 dage.

25

Isolering af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1

- Den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, som koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, kan opnås fra den deponerede organisme *Escherichia coli* DSM 11299 ved hjælp af ekstraktion af plasmid-DNA ved hjælp af kendte metoder (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

35

Medier

YPD: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % glucose (sterilfiltreret) tilsat.

5 YPM: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % maltodextrin (sterilfiltreret) tilsat.

10 x basalsalt: 75 g gær-nitrogenbase, 113 g ravsyre, 68 g NaOH, H₂O til 1000 ml, sterilfiltreret.

10

SC-URA: 100 ml 10 x basalsalt, 28 ml 20 % casaminosyrer uden vitaminer, 10 ml 1 % tryptophan, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 3,6 ml 5 % threonin og 100 ml 20 % glucose eller 20 % galactose tilsat.

15 SC-agar: SC-URA, 20 g/l agar tilsat.

SC-variantagar: 20 g agar, 20 ml 10 x basalsalt, H₂O til 900 ml, autoklaveret.

PEG 4000 (polyethylenglycol, molekylvægt = 4.000) (BDH, England).

20

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

25 Fermentering af *Fusarium oxysporum*-phospholipase

En kultur af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 på et skråstivnet agarsubstrat blev overført til fem 500 ml-rystekolber, hver med 100 ml Bouillon-3-medium, og omrystet ved 30 °C i 1 dag (200 rpm, amplitude 2,5 cm).

30

Sammensætningen af Bouillon-3-medium var som følger:

35	Pepton	6 g/l
	Trypsinfordøjet kasein	4 g/l
	Gærekstrakt	3 g/l
	Kødekstrakt	1,5 g/l
	Glucose	1 g/l

Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

- 5 Dyrkningsmediet fra disse Boullion-3-rystekolber blev anvendt som podedkultur til podning af tyve 500 ml-rystekolber, hver med 200 ml PL-1-medium.

Sammensætningen af PL-1-mediet var som følger:

	Pepton	10 g/l
10	Tween®-80	12 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l
	pH før autoklaving	6,0

- 15 Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

- 20 Hver PL-1-rystekolbe blev podet med 0,5-2 ml Boullion-3-dyrkningsmedium og rystet ved 200 rpm (amplitude 2,5 cm) ved 30 °C i 5 dage. Dyrkningsmediet fra rystekolberne blev puljet ved høst til opnåelse af 3,9 l med et enzymudbytte på 53 LU/ml.

EKSEMPEL 2

Oprensning af phospholipase

- 25 Trin 1) Én liter fermenteringssupernatant blev centrifugeret, og det resulterende præcipitat blev smidt ud. Supernatanten blev herefter justeret til 0,8 M ammoniumacetat ved hjælp af tilsætning af fast ammoniumacetat.
- 30 Trin 2) Hydrofobisk kromatografi - Toyopearl butyl 650 C-matrix blev leveret af Toso Hass (Röhm and Haas Company, Tyskland). En 50 ml-søjle blev pakket med matrixen. Søjlen blev vasket med 50 % ethanol og efterfølgende med vand. Søjlen blev herefter ækvilibreret med 0,8 M ammoniumacetat. Fermenteringssupernatanten, som var justeret med 0,8 M ammoniumacetat,
- 35 blev herefter påsat søjlen. Ubundet materiale blev herefter vasket med 0,8 M ammoniumacetat, indtil alt UV-absorberende materiale (280 nm) var fjernet.

Søjlen blev herefter elueret med vand og efterfølgende med 50 % ethanol.

5 Phospholipase-aktivitet blev bestemt ved pH 4,5 og 40 °C ved anvendelse af Nefa-kittet som beskrevet ovenfor. Fraktioner, som indeholdt aktivitet i vand- og alkohol-eluat, blev puljet. Aktiviteten blev målt ved pH 4,5 ved anvendelse af et Nefa-kitassay.

10 Fraktioner, som indeholdt phospholipase-aktivitet, blev herefter puljet og dialyseret og opkoncentreret ved anvendelse af en Amicon-ultrafiltreringsmembran med en afskæring på 10 kDa.

Trin 3) Negativ absorption på DEAE-hurtigflowkromatografi.

15 DEAE FF blev købt ved Pharmacia, og en 50 ml søjle blev pakket med matrixen.

Søjlen blev herefter vasket som beskrevet af producenten og ækvilibreret med 25 mM Tris-acetatbuffer, pH 7.

20 Den dialyserede og opkoncentrerede prøve blev herefter justeret til pH 7 og konduktans 2 mSi og påsat en DEAE FF-anionbytningsøjle. Aktivitet blev opsamlet som effluent. Aktiviteten binder ikke til en anionbytter ved pH 7.

25 Effluenten fra DEAE FF, som indeholdt aktivitet, blev opkoncentreret og dialyseret ved anvendelse af en Amicon-membran med en afskæring på 10 kDa og en 25 mM natriumacetat-buffer, pH 6.

30 Gelfiltrering på Superdex 75.

Superdex 75-forpakket søjle Hiload Tm 16/60 fra Pharmacia blev vasket og ækvilibreret med 25 mM natriumacetat, pH 6, som indeholdt 150 mM NaCl.

35 To ml af den opkoncentrerede effluent fra anionbytteren, som fremviste phospholipase-aktivitet ved pH 4,5 og 40 °C, blev påsat Superdex-søjlen.

Aktiviteten blev separeret fra ved hjælp af gelfiltrering med en flowhastighed

på 1 ml/minut.

EKSEMPEL 3

- 5 Karakterisering af oprenset phospholipase, som er opnået fra *Fusarium oxysporum*

En karakterisering som beskrevet nedenfor blev udført på en *Fusarium oxysporum*-phospholipase, der var fermenteret som beskrevet i eksempel 1 og oprenset som beskrevet i eksempel 2.

10 Molekylvægten for phospholipase-enzymet blev bestemt ved anvendelse af færdigstøbte 4 til 20 % SDS-PAGE-geler fra Novex Tm. Proteinets molekylvægt blev bestemt under reducerende betingelser som beskrevet tidligere.

15 For *F. oxysporum*-phospholipase viste molekylvægten sig at være 29-30 kDa under reducerende betingelser.

20 Det isoelektriske punkt blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia.
For *F. oxysporum* viste pl for proteinet sig at være omkring neutralt pH, fortrinsvis i intervallet 5,8 til 6,8.

25 Phospholipases termostabilitet

Termostabiliteten for phospholipase fra *Fusarium oxysporum* blev testet ved hjælp af DSC (differentiel scanningskalorimetri). Den termale denatureringstemperatur, T_d, blev aflæst som spidsen af denatureringstoppen i termogrammer (C_p vs. T), der opnåedes efter opvarmning af enzymopløsninger ved en konstant, programmeret opvarmningshastighed.

Eksperimentelt

35 En DSC II fra Hart Scientific (Utah, US, 1993) blev anvendt til forsøgene.

50 mM bufrede opløsninger blev anvendes som opløsningsmiddel for enzymet

(ca. 2 mg/ml) ved enten pH 10 (50 mM glycinbuffer), pH 7 (50 mM HEPES-buffer + 10 mM EDTA) eller pH 4 (50 mM citratbuffer). Enzym blev oprenset ifølge eksempel 2 ovenfor.

- 5 750 µl enzymopløsning blev overført til 1 ml forsejlelige standard-hastelloy-ampuller fra Hart Scientific. Ampuller blev indført i kalorimeteret og nedkølet til 5 °C i 15 minutter. Der blev foretaget termal ækvilibrering før DSC-scanningen. DSC-scanningen blev udført fra 5 °C til 95 °C ved en scanningshastighed på ca. 90 K/time. Denatureringstemperaturer blev bestemt ved en nøjagtighed på
- 10 ca. ± 2 °C.

Resultater:

TABEL 1: Spids af denatureringstop som funktion af pH

15

<u>pH</u>	<u>Td(°C)</u>
4	57 °C
7	62 °C
<u>10</u>	<u>55 °C</u>

20

Det skal bemærkes, at disse forsøg blev udført i fravær af en oliematrix, som kan influere betydeligt på enzymstabilitet. DSC-resultaterne viser en maksimal stabilitet i nærheden af neutralt pH.

25

Hvis man forudsætter irreversibel termal denaturering, er en relevant arbejdstemperatur ved industriel anvendelse, såsom degummering af olier (US 5 264 367), mindst ca. 10 grader lavere end Td-temperaturene, der er anført i tabel 1 ovenfor.

30

Aminoterminal sekvens

Aminoterminal analyse blev udført ved anvendelse af Edman-degradering med Applied Biosystem-udstyr (ABI 473A protein sequencer, Applied Biosystem, USA) som beskrevet af producenten.

35

N-terminal(e) sekvens(er):

For *Fusarium oxysporum*-phospholipasen er den N-terminale sekvens:

N-terminal A-V-G-V-T-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

- 5 Den N-terminale aminosyre "A" (Ala) er position 31 i SEQ ID NO: 2. Dette viser, at det modne phospholipase-enzym ifølge opfindelsen starter i position 31 i SEQ ID NO: 2.

Følgelig er den modne sekvens fra 31-346 i SEQ ID NO: 2.

10

EKSEMPEL 4

Phospholipase A-aktivitet

- 15 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nefa-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant phospholipase A-aktivitet ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

20

EKSEMPEL 5

Aktivitet mod L- α -lysophosphatidylcholin

- 25 Phospholipase-aktiviteten blev bestemt med L- α -lysophosphatidylcholin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nefa-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant aktivitet mod L- α -lysophosphatidylcholin ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

30

EKSEMPEL 6

Phospholipase-aktivitet i enkeltlags-opsætning

- 35 Et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau, KSV5000, KSV Instruments, Finland) er blevet anvendt til måling af forskellige enzymeres aktivitet mod phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin).

Forsøg

På den grundigt oprensede overflade af en bufferopløsning (10 mM TRIS, pH 8,0, 25 °C) blev et enkeltlag af DDPC spredt fra en chloroform-opløsning. Efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m, som svarer til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle. En bufferopløsning (se ovenfor), som indeholder ca. 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen af reaktionsdelen (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet". Enzymatisk aktivitet manifesterer sig ved hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter. Efter at have verificeret, at den vandige opløselighed af reaktionsprodukterne (kaprinsyre og DDPC) er betydelig højere end for DDPC, æstimeres antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut ved hjælp af enzymet, ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

ResultaterTABEL 2. Enzymers aktivitet mod DDPC i en enkeltlags-opstilling

Enzym	Aktivitet ⁷ (nmol/min)
Sigma P9279 (PLA2 fra bigift, 850 U/mg)	1,9
Enzym fra <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
<i>Candida antarctica</i> -B bestanddels-lipase	0
<i>Candida antarctica</i> -A bestanddels-lipase	0
Rekombinant marsvinepancreas-lipase (rGPL)	0,2
Lipolase® (Novo Nordisk A/S)	< 0,1

⁷ Beregnet ud fra reduktion i enkeltlag-areal pr. tidsenhed, induceret ved hjælp af tilstedeværelse af enzym.

"Enzym fra *Fusarium oxysporum*" i tabel 2 er en phospholipase ifølge opfindelsen, der er oprenset som beskrevet i eksempel 2.

Konklusion

Der blev ingen phospholipase-aktivitet påvist for de fleste af enzymerne, bortset fra lipaser, der er opnået fra marsvinelipase, som viste mindre phospholipase-aktivitet.

Phospholipasen ifølge opfindelsen, der var opnået fra *Fusarium oxysporum*, viste overraskende høj signifikant phospholipase-aktivitet.

Følgelig defineres i den foreliggende opfindelse udtrykket "phospholipase-aktivitet", der anvendes heri i forbindelse med en phospholipase ifølge opfindelsen, som en aktivitet, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist ovenfor, er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg. Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgelig som en lipase med phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal, der specificerer phospholipase-aktivitet.

Et eksempel på en lipase med phospholipase-sideaktivitet ifølge definitionerne heri er marsvine-lipasen, der er vist i tabel 2 ovenfor. Nævnte marsvine-lipase har en phospholipase-sideaktivitet i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er mindre end 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg.

EKSEMPEL 7

Kloning og ekspression af en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672

Kloning og ekspression blev udført ved anvendelse af ekspressionskloning-i-gær-teknikken som beskrevet ovenfor.

mRNA blev isoleret fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, der var dyrket som beskrevet ovenfor, herunder bevægelse for at sikre tilstrækkelig ilttilførsel.

5 Mycelia blev høstet efter 3-5 dages vækst, straks nedfrosset i væskeformig nitrogen og opbevaret ved -80 °C. Et bibliotek fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, som bestod af ca. 9×10^5 individuelle kloner, blev konstrueret i *E. coli* som beskrevet med en vektorbaggrund på 1 %. Plasmid-DNA fra nogle af puljerne blev transformeret ind i gær, og der opnåedes 50-100 skåle, som indeholdt 250-400 gærkolonier, fra hver pulje.

10 Phospholipase-positive kolonier blev identificeret og isoleret i substratskåle (se ovenfor). cDNA-inserts blev amplificeret direkte fra gærkolonierne og karakteriseret som beskrevet i Materialer og metoder-afsnittet ovenfor. DNA-sekvensen for cDNA'et, der koder for phospholipasen, er vist i SEQ ID NO: 1, og den tilsvarende aminosyresekvens er vist i SEQ ID NO: 2. I SEQ ID NO: 1 definerer DNA-nukleotiderne fra nr. 23 til nr. 1060 det phospholipase-kodende område. Den del af DNA-sekvensen i SEQ ID NO: 1, som koder for den
15 modne del af phospholipasen, omfatter positionerne 113 til 1060, der svarer til aminosyrepositionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2.

cDNA'et er opnåeligt fra plasmidet i DSM 11299.

20 Totalt DNA blev isoleret fra en gærkoloni, og plasmid-DNA blev indvundet ved hjælp af transformation af *E. coli* som beskrevet ovenfor. For at udtrykke phospholipasen i *Aspergillus* blev DNA'et fordøjet med passende restriktionsenzymer og størrelsesfraktioneret på gel, og et fragment, som svarede til phospholipasegenet, blev oprenset. Genet blev efterfølgende ligeret
25 til pHD414 og fordøjet med passende restriktionsenzymer til opnåelse af plasmidet pA2PH10.

Efter amplifikation af DNA'et i *E. coli* blev plasmidet transformeret ind i *Aspergillus oryzae* som beskrevet ovenfor.

30

Test af *A. oryzae*-transformanter

Hver af transformanterne blev testet for enzymaktivitet som beskrevet ovenfor. Nogle af transformanterne havde en phospholipase-aktivitet, som var
35 signifikant højere end *Aspergillus oryzae*-baggrunden. Dette viser effektiv ekspression af phospholipasen i *Aspergillus oryzae*.

EKSEMPEL 8Rekombinant ekspression af en *Fusarium oxysporum*-phospholipase

- 5 En *A. oryzae*-transformant, som omfattede *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pA2PH10 (se eksempel 7), blev tilførsels-batchfermenteret som beskrevet ovenfor. Oprensning af den rekombinant producerede *F. oxysporum*-phospholipase blev udført som beskrevet i eksempel 2.

10 EKSEMPEL 9Karakterisering af en rekombinant udtrykt og oprenset phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

- 15 Karakteriseringen blev udført på en rekombinant udtrykt og efterfølgende oprenset *Fusarium oxysporum*-phospholipase (se eksempel 8).

- 20 Disse karakteriseringsresultater med hensyn til den rekombinante *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen svarer perfekt overens med karakteriseringsresultaterne, der er vist i eksempel 3, hvor det blev vist, at det rekombinant udtrykte og oprensede enzym var det samme som den ikke-rekombinant udtrykte og oprensede phospholipase, der blev karakteriseret i eksempel 3.

- 25 Generelle assays, som anvendes til at karakterisere en rekombinant produceret phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*

Phospholipase-assays

- 30 Phospholipase-aktivitet (PHLU) blev målt som frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin. 50 µl 4 % L- α -phosphatidylcholin (plante-lecithin fra Avanti, USA), 45 % Triton X-100, 5 mM CaCl₂ i 50 mM HEPES, pH 7, blev tilsat, 50 µl enzymopløsning, som var fortyndet til en passende koncentration i 50 mM HEPES, pH 7. Prøverne blev inkuberet i 10 minutter ved 30 °C, og reaktionen blev
- 35 standset ved 95 °C i 5 minutter før centrifugering (5 minutter ved 7000 rpm). Fri fedtsyrer blev bestemt ved anvendelse af Nefa C-kittet fra Wako Chemicals GmbH; 25 µl reaktionsblanding blev tilsat til 250 µl reagens A og inkuberet i 10

5 minutter ved 37 °C. Herefter blev 500 µl reagens B tilsat, og prøven blev inkuberet igen, 10 minutter ved 37 °C. Absorptionen ved 550 nm blev målt ved anvendelse af et HP 8452A dioderække-spektrofotometer. Prøver blev analyseret mindst in duplo. Substrat- og enzymblindprøver (forvarmede enzymprøver (10 minutter ved 95 °C) + substrat) blev indbefattet. Oleinsyre blev anvendt som fedtsyrestandard. 1 PHLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut under disse betingelser.

Alternativt blev assayet kørt ved 37 °C i 20 mM citratbuffer, pH 5 (Ca^{2+} -afhængighed) eller 20 mM Britton-Robinson-buffer (pH-profil/temperaturprofil/stabilitet).

Phospholipase A1-aktivitet (PLA1) blev målt ved anvendelse af 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin (D3761 Molecular Probes) som substrat. 190 µl substrat (100 µl D3761 (2 mg/ml i ethanol) + 50 µl 1 % Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl_2 , pH 7) i en 200 µl-kuvette blev tilsat 10 µl enzym, og absorptionen ved 410 nm blev målt som funktion af tiden på HP 8452A-dioderække-spektrofotometeret ved stuetemperatur. Aktivitet blev beregnet som kurvens hældning i det lineære område. PLA1 svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre (thiol)/minut ved disse betingelser.

Phospholipase A2-aktivitet (PLA2) blev målt ved 40 °C ved anvendelse af 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (H361 Molecular Probes). 2 ml substrat (50 µl 1 % Triton X-100 + 25 µl 0,1 % H361 i methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) i en 2 ml-kuvette med omrøring blev tilsat 10 µl enzym, og pyren-fluorescens-emissionen blev målt ved 376 nm (excitation ved 340 nm) som funktion af tiden (1 sekund-intervaller) ved anvendelse af Perkin Elmer LS50-apparatet. I Triton X-100/phospholipid-micellerne blev koncentrationen af phospholipid justeret til at have excimerdannelse (emitterer ved 480 nm). Ved spaltning frigøres fedtsyren i 2-positionen, som indeholder pyrengruppen, til vandfasen, hvilket resulterer i en stigning i monomer-emissionen. PLA2 blev beregnet som hældningen af kurven i det lineære område ved tilsvarende betingelser.

Lipase-assays

Lipase-aktivitet (LU) blev målt ifølge Novo Nordisk publikation AF 95. Hydrolysen af tributyrin ved 30 °C og pH 7 blev efterfulgt af et pH-stat-titreringsforsøg. 1 LU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol smørsyre/minut under standardbetingelser.

5

Aktivitet på olivenolie (SLU) blev målt som følger: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9, blev tilsat til 2,5 ml Sigma Lipase-substrat. pH blev justeret til pH 9 eller lige under før tilsætning af 0,5 ml lipase-opløsning (fortyndet i buffer) og udførsel af et pH-stat-titreringsassay ved 30 °C ved anvendelse af Titalab, som er kommercielt tilgængeligt fra Radiometer A/S, København, Danmark. 1 SLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut ved pH 9, 30 °C.

10

15 Karakterisering af en rekombinant fremstillet *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

Assayene, som blev anvendt til karakterisering af enzymene, der er nævnt nedenfor, var assayene, der er beskrevet umiddelbart ovenfor.

20

Enzymer

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

25

Enzymet blev rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Lecitase™ Batch L546-F06 (10368 IU/ml, ca. 20 mg/ml). Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

30

Ca²⁺'s indflydelse på phospholipase-aktiviteten hos *F. oxysporum*-lipase-phospholipase blev undersøgt. Der observeredes ingen større forskel, uanset om EDTA eller Ca²⁺ var indbefattet i assayet eller ej (se tabel 3 nedenfor), og enzymet synes således at være relativt uafhængigt af Ca²⁺.

35

TABEL 3. *F. oxysporum*-phospholipase-aktivitets (PHLU) afhængighed af EDTA og CaCl₂ - 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5 ved 37 °C

	5 mM	1 mM	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
	EDTA	EDTA	CaCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂

Relativ aktivitet ¹	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89
--------------------------------	------	------	---	------	------	------

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved 1 mM CaCl₂, der er normaliseret til 1.

5

pH-profilen blev undersøgt i Britton-Robinson-buffer ved anvendelse af plantelecithin som substrat (tabel 4). Selvom enzymet viser en alkalisk pH-profil på phospholipid med et optimum ved pH 9 eller højere, er aktiviteten stadig tilstrækkelig høj til tilvejebringelse af degummering af olier ved lavt pH og anvendelse ved bagning (se nedenfor for en sammenligning af specifikke aktiviteter).

10

TABEL 4. *Fusarium oxysporum*-phospholipases pH-profil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR, 37 °C

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Relativ aktivitet ¹	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved pH 9, der er normaliseret til 1.

- 5 Temperaturprofiler for phospholipasen opnåedes ved pH 5; aktiviteten begynder at falde ved temperaturer over 40 °C (tabel 5). Dette er i rimelig overensstemmelse med temperaturstabiliteten, der måles ved præinkubering af enzymet og efterfølgende måling af residual-aktivitet (tabel 6), hvor enzymet er stabilt ved temperaturer op til 45 °C ved pH 5.

10

TABEL 5. *F. oxysporum*-phospholipase's temperaturprofil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR

	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

Alle data er vist som relative aktivitetsdata i forhold til aktiviteten ved pH 5, 40 °C, der er normaliseret til 1.

15

TABEL 6. *Fusarium oxysporum*-phospholipases temperaturstabilitet; præinkubation 30 minutter i 20 mM BR

	5 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Alle data er vist som residualaktivitetsdata, hvor aktiviteten efter præinkubation ved 5 °C er normaliseret til 1.

20

Enzymets lave stabilitet kan være fordelagtig til registrering af et eventuelt produkt som en proceshjælp, da det aktive enzym ikke bør forventes i slutproduktet ved hverken degummering af spiseolier eller i bagte produkter.

25

Phospholipasen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen, har både phospholipase- og lipase-aktivitet.

Følgelig blev enzymets aktivitet på forskellige lipase- og phospholipase-substrater undersøgt og sammenlignet med aktiviteten hos den kommercielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ og den kommercielt tilgængelige lipase Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

5 *F. oxysporum*-phospholipase/lipasen har høj aktivitet på både tributyrin og olivenolie ved pH 7 og 9 (tabel 7). Til sammenligning er den specifikke aktivitet hos Lipolase® ca. 5000 LU/mg. Imidlertid fremviser *F. oxysporum*-lipasen i modsætning til Lipolase® en meget bredere specificitet med betydelig
10 phospholipase-aktivitet og også thioesterase-aktivitet (se enkeltlags-eksempel 6 ovenfor, som viser, at Lipolase® ikke har en målbar phospholipase-aktivitet).

F. oxysporum-phospholipase/lipasen ifølge opfindelsen har en specifik aktivitet på lecithin, som er betydelig højere end den hos phospholipasen Lecitase™
15 (svinepancreas-PLA2) ved pH 7 (tabel 7).

Sammenlignet med Lecitase™ har *F. oxysporum*-enzymet en 100 gange højere aktivitet ved pH 7. Phospholipase:lipase-forholdet for *F. oxysporum*-enzymet er ca. 0,225 (1000 LU/mg/225 PHLU/mg) under tilsvarende
20 betingelser (pH 7 og 30 °C).

TABEL 7. *F. oxysporum*-lipase/phospholipasens aktivitet - sammenligning med Lecitase™

Enzym	LU/mg	PLU ¹ /mg	PHLU/mg	SLU/mg	PLA1/mg
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase™	<0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

¹PLU blev målt i lighed med PHLU men i 20 mM citrat, pH 5 og ved 37 °C i
25 stedet for 50 mM HEPES, pH 7 ved 30 °C.

F. oxysporum-lipase/phospholipasens specificitet blev undersøgt ved
30 anvendelse af substrater, der er specifikke for phospholipase A1, ved måling af spaltningen af thioester-bindingen i 1-positionen i 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin.

Enzymet hydrolyserer klart 1-positionen i phospholipid (tabel 7), mens Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) som forventet ikke viste aktivitet på dette

substrat.

C-terminal aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen ifølge opfindelsen

5

Den N-terminale aminosyresekvens for det rekombinant udtrykte modne phospholipase-protein blev bestemt som beskrevet i eksempel 3, og det blev fastslået, at denne N-terminale sekvens var den samme som bestemt for det ikke-rekombinant dannede og oprensede enzym (se eksempel 3).

10

MALDI-TOF-massespektrometri blev udført ved anvendelse af et VG ToFSpec-massespektrometer (Micromass, Manchester, UK) som beskrevet i Christgau et al., Biochem. J. 319:705-712, 1996.

15

Baggrund

Den N-terminale aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen, som er udledt fra DNA-sekvensen, forudser i kombination med den kendte N-terminale aminosyresekvens for den modne phospholipase et protein på 315 aminosyrerester (aminosyre 31-346 i SEQ ID NO: 2). Den teoretiske masse for dette udledte protein er 33.256,8 Da.

20

Ved anvendelse af MALDI-TOF-massespektrometri har vi tidligere bestemt massen af den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* til at være 28,2 kDa (data ikke vist), og på SDS-PAGE viste det sig, at molekylvægten er 29-30 kDa (se ovenfor).

25

Da de N-terminale sekvenser for den native og den rekombinante *F. oxysporum*-lipase er identiske, er det sandsynligt, at masseforskellen, som ses mellem den udledte masse og den eksperimentelle masse, er forårsaget af C-terminal processering.

30

For at undersøge dette har vi isoleret det C-terminale peptid fra den rekombinante *F. oxysporum*-lipase, som er udtrykt i *A. oryzae*, og sekventeret det gennem dets C-terminal.

35

Strategi

5 Den gennemsnitlige masse for den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* på 28,2 kDa kan anvendes til at forudsige den mest sandsynlige C-terminale rest, som viser sig at være Ser303 (SEQ ID NO: 2).

10 Denne forudsigelse er baseret på den formodning, at enzymet er ikke-glycosyleret. Det enkelte potentielle N-glycosyleringssite, som findes i sekvensen i Asn163, anvendes sandsynligvis ikke, da der findes en Pro-rest i position 164. Tilstedeværelsen af en Pro-rest i den anden rest i konsensussekvensen for N-glycosylering (Asn-Xaa-Ser/Thr) er aldrig blevet rapporteret. Endvidere tyder formen af toppen i massespektret ikke på glycosylering. Toppen er imidlertid bredere, end man sædvanligvis oplever for homogene proteiner, hvilket indikerer muligheden for størrelsheterogenitet.

15 Da enzymets N-terminal er veldefineret, er størrelsheterogeniteten mest sandsynligt forårsaget af heterogen C-terminal processering.

20 En gennemgang af SEQ ID NO: 2 (se nedenfor) viser, at den udledte C-terminal er placeret tæt på den sidste af de 8 Cys-rester i sekvensen. Indførelse af en radioaktiv tag på Cys-resterne gør peptiderne, der indeholder Cys-rester, lette at spore gennem peptidoprensning. En kombination af den radioaktive tagging med proteolytisk degradering ved anvendelse af Asp-N-proteasen, som spalter foran Asp-rester, vil resultere i et tagget C-terminalt peptid. Endvidere vil tre indre peptider blive tagget. Sekventering af alle

25 taggede peptider vil afsløre enzymets C-terminal.

SEQ ID NO: 2: Udledt aminosyresekvens for *F. oxysporum*-lipase/phospholipasen.

5 Sekvensen er udledt fra DNA-sekvensen og starter i N-terminalen, som er
bestemt eksperimentelt for både det native og det rekombinante enzym. De 8
Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, som er udledt ved
hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.
Asn-resten, som findes i konsensussekvensen for N-glycosylering (NXS/T) er
10 vist med (◊), men benyttes efter al sandsynlighed ikke, da X er en Pro-rest.

15 Enzymet var PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

NZAS-0007520

Enzymet blev udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

Enzymet blev denatureret og disulfidbindingerne blev reduceret, før thiolgrupperne blev reageret med I-[1-¹⁴C]-CH₂CONH₂.

5

Efter den radioaktive tagging af Cys-resterne blev lipasen degraderet ved anvendelse af Asp-N-proteasen.

10

De dannede peptider blev fraktioneret ved anvendelse af modfase-HPLC. De opsamlede fraktioner blev udsat for MALDI-TOF-massespektrometri og scintillationstælling. Fraktioner, som indeholdt betydelige mængder af radioaktivitet, blev valgt til fornyet oprenset ved anvendelse af modfase-HPLC.

15

De påny oprensede fraktioner blev udsat for scintillationstælling, og fraktionerne, som indeholdt radioaktivitet, blev efterfølgende sekventeret.

20

Nedenfor er vist en oversigt over resultaterne. Dette skema kan se kaotisk ud på grund af de mange anførte sekvenser. Skemaet indeholder imidlertid al den sekvensdata, der er opnået fra de radioaktive fraktioner, og udgør derfor grundlaget for de dragede konklusioner. Det skal bemærkes, at alle Cys-rester er dækket ved sekventeringen, de fleste af dem mere end en gang. En anden ting at bemærke er, at de afvigende spaltninger, som ses, resulterer i et stort antal små radioaktivt mærkede peptider.

U U U
 NG CPT
 NNG CPTVQ
 CSN
 CSNNG CP
 CSNNG CPTV

CNSEAAA GSKI

31 AVGVTTDF5 NFKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQNGAT 80

U
 DCS
 DCS

81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR CSINIRNWL T NLDPCQEDCS 130

U

LVSGC

LVSGCGVHSG FORAM

131 LVSGCGVHSG FORAMWEISS QATAAVASAR KAMPSPWVIS TCHSLGGAVA 180

181 VLAAANLRVG GTPVDIYTYG SPRVCNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

U U

DVKVCEG

DVKVCEGA ANLGCNCGTL

DVKVCEGA ANLGCNCGTL

231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS GCGGDKVDYT ISDVKVCEGA ANLGCNCGTL 280

U

DACNAG GFS

GL

TDACNAG GP

281 GLDIAANLHY PQATDACNAG GPSWRYRSA ESDVKRATMT DAELEKOLNS 330

↑

331 YVOMDKETVK NNQARS

5 Aminosyresekvenserne, der er opnået ved hjælp af sekventering af de radioaktivt taggedede peptider, stammede fra rekombinant *F. oxysporum*-enzym. Sekvenserne er parallelopstillet med aminosyresekvensen, der er udledt fra DNA-sekvensen. De 8 Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, der er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.

Forsøgskonklusion

10 Ud fra sekventeringen af alle de radioaktivt taggedede peptider er det klart, at den C-terminale del af aminosyresekvensen, der kodes i DNA'et, processeres under ekspressionen af lipasen fra *F. oxysporum*. Peptidsekvenserne peger på Ser303 som den mest sandsynlige C-terminale rest i det modne enzym i overensstemmelse med resultatet fra MALDI-TOF-massespektrometri.

15 På basis af dataene kan det imidlertid ikke udelukkes, at der finder differentiell C-terminal processing sted, som fører til heterogene C-termini, for eksempel tyder ét peptid på, at Phe272 også kan findes som en C-terminal rest.

20 EKSEMPEL 10

Generel beskrivelse af assay for enzymatisk degumming af spiseolie

Udstyr til udførelse af enzymatisk degumming

25 Udstyret består af en 1 l-kappebeklædt stålreaktor, som er udstyret med et stållåg, en skrue (600 rpm), skærme, en temperaturføler, et indløbsrør i toppen, en tilbageløbskøler (4 °C) i toppen og et udløbsrør i bunden. Reaktorkappen er forbundet med et termostatbad. Udløbsrøret er ved hjælp af
30 silikoneslanger forbundet til et Silverson-i linie-blandehoved, der er udstyret med en "firkantet hul- høj shearing-skærm", som styres af en Silverson L4RT-høj shearing-lab-blander (8500 rpm, flow ca. 1,1 l/minut). Blandehovedet er udstyret med en køleslange (5-10 °C) og et udløbsrør, der via silikoneslanger er forbundet med reaktorens indløbsrør. En temperaturføler er indsat i
35 silikoneslangen umiddelbart efter blandehovedet. Den eneste forbindelse fra reaktor/blandehoved-systemet til atmosfæren er gennem tilbageløbskøleren.

Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering

- 5 Alt køle- og termostatstyr tændes. Herefter indføres 0,6 l (ca. 560 g) olie i reaktoren, som holdes på ca. den temperatur, der er nødvendig for det specifikke forsøg. Lab-blanderen tændes, hvorved olien starter med at cirkulere fra reaktoren til blandehovedet og tilbage til reaktoren. Systemet får mulighed for at ækvilibrere i ca. 10 minutter, i løbet af hvilket tidsrum temperaturen finindstilles. Forbehandlingsperioden starter med tilsætning af 0,6 g (2,86 mmol) citronsyremonohydrat i 27 g MilliQ-vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % (vægt/vægt; [citronsyre]) i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM), hvilket sætter $t = 0$. Til $t = 30$ minutter tilsættes en passende mængde af en 4 M NaOH-opløsning.
- 10
- | | |
|-------------------------------|-----------|
| 0,0 ækviv. 4 M NaOH | -> pH 3,7 |
| 1,0 ækviv. 4 M NaOH (0,71 ml) | -> pH 4,5 |
| 1,5 ækviv. 4 M NaOH (1,07 ml) | -> pH 5,0 |
| 2,0 ækviv. 4 M NaOH (1,43 ml) | -> pH 5,5 |
| 2,5 ækviv. 4 M NaOH (1,79 ml) | -> pH 6,2 |
| 3,0 ækviv. 4 M NaOH (2,14 ml) | -> pH 8,0 |
- 15
- 20 Til $t = 35$ minutter udtages prøver til P-analyse og pH-bestemmelse. Umiddelbart herefter tilsættes den nødvendige mængde af enzym-opløsning (slut på forbehandlingsperiode). Prøver til P-analyse og pH-stemmelse udtages til $t = 1, 2, 3, 5, 6$ timer, og herefter standses reaktionen.
- 25
- 30 Reaktor/blande-systemet tømmes og vaskes med 2 x 500 ml 10 % Deconex/DI-vandopløsning efterfulgt af minimum 3 x 500 ml DI-vand. Tabel 8 viser en oversigt over de forskellige tilsætninger og prøvetagninger under reaktionen.

TABEL 8. Plan for enzymatisk degummering

Tid	Tilsætning af	Prøvetagning	
		P-analyse	pH-bestemmelse
		X	
0	Citronsyre		
5 min.			X
30 min.		X	X
30 + δ min.	NaOH		
35 min.		X	X
35 + δ min.	Enzym		
1 time		X	X
2 timer		X	X
3,5 timer		X	X
5 timer		X	X
6 timer		X	X

Phosphor-analyse

5 Prøvetagning til P-analyse:

Anbring 10 ml vand-i-olie-emulsion i et glascentrifugerør. Opvarm emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter. Centrifuger ved 5000 rpm i 10 minutter. Overfør ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et 12 ml-polystyrenrør og lad det stå (til bundfældning) i 12-24 timer. Efter bundfældning udtag ca. 1-2 g fra den øverste klare fase til P-analyse.

10 P-analyse blev udført i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)":

15 Afvej 100 mg MgO (leicht, Merck nr. 5862) i en porcelænskål og opvarm med

- 5 en gasbrænder. Tilsæt 1-2 g olie og antænd med en gasbrænder til opnåelse af en sort, hård masse. Opvarm i en Vecstar-ovn ved 850 °C i 2 timer til opnåelse af hvid aske. Opløs asken i 5 ml 6 M HNO₃ og tilsæt 20 ml reagensblanding. Hensæt i 20 minutter. Mål absorbans ved 460 nm (anvend en blank (5 ml HNO₃ + 20 ml reagensblanding) til nuljustering). Beregn ved anvendelse af kalibreringskurve.

pH-bestemmelse

- 10 Udtag 2 ml vand-i-olie-emulsion og bland med 2 ml MilliQ-vand. Efter faseseparatoring afpipetter det øverste olielag. Mål pH i vandfase med pH-elektrode Orion. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af formlen:

15
$$pH_{\text{reel}} = pH_{\text{målt}} - 0,38.$$

- 20 En kalibreringskurve opnåedes ved hjælp af opløsning af 0,6 g citronsyremonohydrat i 27 g DI-vand, pH i denne opløsning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{reel}). 100 µl blev blandet med 2 ml MilliQ-vand, og pH i denne opløsning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{målt}). pH i citronsyre-opløsningen blev ændret gradvist ved hjælp af tilsætning af NaOH-opløsning, og for hver justering blev fortynding og pH-målinger udført som beskrevet ovenfor.

25 EKSEMPEL 11

Optimale degummeringsbetingelser for Lecitase™

- 30 Alle forsøg vedrørende degummering af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

- Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.
Batch C00730/B01200, 9 kg, P-indhold 186 ppm (0,47 % phosphatid).
35 Olien er ikke et kommercielt tilgængeligt produkt, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

Enzym:

Lecitase™ 10L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

- 5 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med Lecitase™ er vist i tabel 9. Standardbetingelser er: enzymdosis 535 U/kg olie (1,1 mg/kg olie), 60 °C, 2,0 ækviv. NaOH (pH 5,5). Enzymdosen er varieret fra 268-1070 U/kg olie, temperaturen er varieret fra 40-70 °C, og NaOH-tilsætning er varieret fra 1,0-3,0 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i
- 10 tabel 9.

TABEL 9. Specifikke betingelser for Lecitase™-optimering

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (U/kg olie)
10	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	0 (blind)
21	Colzro 1208	60 °C	0,0	3,7	0 (blind)
8	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
9	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
11	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	268
12	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	1070
15	Colzro 1200	70 °C	2,0	5,5	535
17	Colzro 1200	50 °C	2,0	5,5	535
18	Colzro 1200	40 °C	2,0	5,5	535
19	Colzro 1200	60 °C	1,0	4,5	535
40	Colzro 1209	60 °C	1,5	5,0	535
44	Colzro 1429	60 °C	2,5	7,0	535
20	Colzro 1200	60 °C	3,0	8,0	535

pH fra t = 35 minutter - 6 timer. Indenfor dette tidsrum var alle pH-bestemmelser inden for et smalt interval. Dette illustreres yderligere i eksempel 13 nedenfor.

En oversigt over de separate optimeringsundersøgelser er vist i tabel 10.

Resultaterne i tabel 10 viser:

- 5 i) at det af dosis/reaktions-undersøgelsen fremgår, at optimal enzymdosis (ved 60 °C og 2,0 ækviv. NaOH) er ca. 535 U/kg olie. Halv dosis øger degummeringstiden fra ca. 3,5 timer til 6 timer, og dobbelt dosis frembringer ingen ændring i degummeringsydeevnen. Enzymblindprøve-resultaterne er indsat til sammenligning,
- 10 ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) med dårlig ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5) og 3,0 ækviv. (pH ca. 8),
- 15 iii) at optimal temperatur er ca. 60 °C, da 70 °C ikke bringer P-niveauet helt ned, 50 °C øger degummeringstiden fra ca. 3,5 til 6 timer, og 40 °C giver dårlig ydeevne.

TABEL 10: Resultater vedrørende optimering af Lecitase™-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
10	160	140	116	118	108	109	105	109
21	178	149	-	143	142	143	147	154
8	164	139	117	85	30	-	2	3
9	164	136	109	79	14	4	3	4
11	183	149	123	104	78	35	10	7
12	165	131	117	71	13	3	4	3
15	170	139	127	83	23	10	11	9
17	162	134	127	95	56	15	11	5
18	176	151	136	100	66	28	24	28
19	171	139	147	142	142	118	91	80
40	184	149	157	126	109	73	40	30
44	226	202	197	148	99	66	40	34
20	165	136	111	102	90	81	73	72

¹Phosphorindhold (ppm) i oliephase ved angivne tidspunkter i timer.

5 EKSEMPEL 12

Optimale degummeringsbetingelser for en *Fusarium oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

- 10 Alle forsøg med enzymatisk degummering af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00730/B01208, P-indhold ca. 200 ppm

Batch C00730/B01209, P-indhold ca. 200 ppm

5 Batch C00730/B01429, P-indhold 227 ppm

Batch C00730/B01430, P-indhold 252 ppm

Olierne er ikke kommercielt tilgængelige, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

10 Enzym:

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.

15 Enzymet var udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

20 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med PL fra *Fusarium oxysporum* er vist i tabel 11. Standardbetingelser er: enzymdosis 1,6 mg/kg olie, 40 °C, 1,5 ækviv. NaOH (pH ca. 5,0). Enzymdosis er varieret fra 0,2-1,6 mg/kg olie, temperaturen er varieret fra 30-50 °C, og NaOH-tilsætningen er varieret fra 1,0-2,5 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 11.

TABEL 11. Specifikke betingelser til optimering af PL fra *Fusarium oxysporum*

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (mg/kg olie)
31	Colzro 1208	40 °C	1,5	5,0	1,6
53	Colzro 1429	40 °C	1,5	5,3	1,6
33	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,8
35	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,4
36	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,2
38	Colzro 1209	50 °C	1,5	5,0	1,6
64	Colzro 1430	45 °C	1,5	5,0	1,6
39	Colzro 1209	30 °C	1,5	5,0	1,6
32	Colzro 1209	40 °C	1,0	3,5	1,6
13	Colzro 1200	40 °C	1,0	4,5	1,6
45	Colzro 1429	40 °C	1,25	5,0	1,6
46	Colzro 1429	40 °C	1,75	5,5	1,6
34	Colzro 1209	40 °C	2,0	5,5	1,6
37	Colzro 1209	40 °C	2,5	6,2	1,6

Forsøgsresultaterne er vist i tabel 12 nedenfor. pH-afgivelse i tidsvinduet 35 minutter - 6 timer faldt alle inden for de forventede intervaller med kun mindre uregelmæssigheder.

Sammenfattet viser resultaterne i tabel 12 nedenfor:

- i) at det af dosis/reaktions-testene fremgår, at den optimale enzymdosis (ved 40 °C og 1,5 ækviv. NaOH) er ca. 0,8 mg/kg olie,
- ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 1,5 ækviv. (pH ca. 5,0) med ingen ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5), med begrænset ydeevne ved 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) og 2,5 ækviv. (pH ca. 6,2), og

iii) at den optimale temperatur er ca. 45 °C, og 50 °C giver begrænset ydeevne.

5 TABEL 12: Resultater vedrørende optimering af *Fusarium oxysporum*-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
31	169	130	136	15	8	7	8	7
53	232	203	208	32	10	7	7	4
33	188	156	160	27	7	6	6	8
35	181	153	153	78	5	5	4	6
36	187	162	157	117	61	32	20	15
38	187	149	146	84	83	68	58	55
64	252	192	201	10	4	4	4	4
39	184	163	158	36	7	7	9	9
32	167	137	165	152	146	151	148	146
13	170	140	141	140	133	126	130	131
45	221	189	195	161	118	99	92	95
46	225	187	163	93	4	7	6	15
34	189	174	165	61	27	25	26	19
37	205	168	157	88	22	23	20	21

¹Phosphorindhold (ppm) i oliephase på angivne tidspunkter i timer.

EKSEMPEL 13Visning af standard-pH-afvigelser under en enzymatisk degummeringsproces

- 5 Tabel 13 nedenfor viser et gennemsnitseksempel for pH-afvigelser under den enzymatiske degummeringsproces, der udføres som beskrevet i eksempel 10.

Forsøgene udføres med Lecitase™. Se eksempel 11 for yderligere detaljer.

10 TABEL 13: pH-værdier fra t = 35 minutter - 6 timer

Tid (timer)	pH Forsøg 8 (2,0 ækv)	pH Forsøg 15 (2,0 ækv)	pH Forsøg 19 (1,0 ækv)	pH Forsøg 20 (3,0 ækv)
0,58	4,97	5,80	4,45	7,38
1,0	5,82	5,75	4,46	7,63
2,0	5,50	5,44	4,57	8,13
3,5	5,35	5,34	-	8,37
5,0	5,25	5,47	4,47	8,21
6,0	5,01	5,26	4,43	8,05

Hvis ikke andet er angivet i eksemplerne på forsøg med enzymatisk degumming, der er beskrevet heri, var standard-pH-afvigelserne i nævnte forsøg som vist i tabel 13 ovenfor.

EKSEMPEL 14Sammenligning af enzymatisk degummeringskapacitet hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen

20 I figur 2 er vist resultaterne fra PL'erne under deres respektive optimale betingelser, som bestemt i eksempel 11 og 12 ovenfor.

Forsøgsbetingelser, der er vist i figur 2:

Lecitase™: 60 °C, pH 5,5 (2,0 ækviv. NaOH) og 1 mg enzym/kg olie (ca. 535 U) (forsøg nr. 9).

5 *Fusarium oxysporum* PL: 40 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 0,8 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 33).

Fusarium oxysporum PL: 45 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 1,6 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 64).

10 Tilsyneladende giver PL fra *Fusarium oxysporum* en meget hurtig degummeringseffekt sammenlignet med Lecitase™.

PL fra *Fusarium* ifølge opfindelsen giver en næsten total degummering efter ca. 25 minutters kontakt mellem enzym og olie.

15

EKSEMPEL 15

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i forskellige typer af spiseolier

20

Olier:

Rårapssfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.

Denne batch indeholder faste rester.

25

Rårapssfrøolie fra Scanola (Danmark).

Batch C00745/B01593, P-indhold 315 ppm.

Filtreret rårapssfrøolie.

30 Batch C00745/B01146 filtreret, P-indhold 231 ppm.

Denne olie er Batch C00745/B01146 ovenfor (609 ppm), der er filtreret gennem et 100 µm Johnson-filter.

Rårapssfrøolie fra Arhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

35 Batch C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Rapsfrøolie fra Lurgi, Tyskland.

Batch C00932/B1381, P-indhold 148 ppm.

Råsojabønneolie fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00744/B01145, P-indhold 593 ppm.

5

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor, blev udført ved hjælp af forbehandling af olierne ved hjælp af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

I korte træk omfatter forbehandlingsprocessen,

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

15

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

20

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

25

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer,

efter bundfældning udtog 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien. ppm-værdien blev bestemt som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

30

Ifølge denne proces var mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som var til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor:

35

rårapfrøolien nr. 1146 fra AOM, der indeholder fast partikelholdigt materiale, som til dels er ansvarligt for det høje P-niveau (609 ppm), filtrering gennem et 100 µm Johnson-filter gav en klar olie med et P-indhold på 231 ppm.

Forbehandling af råolien og af den filtrerede olie gav et P-niveau på 140 ppm, som er et mål for de ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i olien;

5 phospholipid-indholdet i en råapsfrøolie fra Scanola blev reduceret fra 315 ppm til ca. 30 ppm ved hjælp af forbehandling,

phospholipid-indholdet i en rapsfrøolie, som var opnået fra Lurgi (sandsynligvis vilkårlig blanding af råolie og totalt raffineret olie), blev reduceret til 60 ppm ved hjælp af forbehandlingsprocessen,

10 forbehandling råapsfrøolie nr. 1710 fra AOM reducerede P-indholdet fra 459 til 200-250 ppm,

15 ved råsojabønneolie nr. 1145 fra AOM reducerede forbehandling P-niveauet fra 593 til 10 ppm. Denne sojabønneolie er et eksempel på en olie, der kan degummes ved hjælp af vanddegumming/citrat-behandling alene. Enzymtilsætning til denne råsojabønneolie efter forbehandling reducerede ikke P-indholdet yderligere.

20 Disse data viser, at phospholipid-sammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) i råapsfrøolie varierer meget fra én batch til en anden, og følgelig vil niveauet af resterende phospholipid i vanddegummet rapsfrøolie variere over et bredt interval (30 ppm (Scanola) til 200-250 ppm (AOM)).

25 Til enzymatisk degumming afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbart phospholipid, som er til stede efter degumming eller forbehandling.

30 Endvidere gælder det, at jo højere mængde af ikke-hydrerbart phospholipid, der er til stede i olien, jo mere anvendelig er den enzymatiske degummeringsmetode.

35 Dette illustreres også i eksempel 16 nedenfor, hvor den foreliggende opfindelse viser enzymatisk degumming af råapsfrøolie nr. 1146, som har et ikke-hydrerbart phospholipid-niveau på ca. 140 ppm.

EKSEMPEL 16Degumming af rårapfrø-spiseolie (I)

- 5 Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degumming" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

- 10 Rårapfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.
Denne batch indeholder faste rester.

Enzym:

- 15 Lecitase™ 10 L.
Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

- 20 Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.
Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A (reference)

- 25 0,6 l (580 g) rårapfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes 30 µl (300 U) Lecitase™ 10L (som er leveret af Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i tabel 14.
- 30

TABEL 14. Resultater fra degummering af råapsfrøolie med Lecitase™

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,8
0,58	146	5,6
1,0	127	5,6
2,0	88	5,7
3,5	61	5,7
5,0	44	5,6
6,0	34	5,8

Forsøg B

- 5 0,6 l (581 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,4. Til t = 35 minutter tilsættes 1 ml (0,9 mg) af en oprenset opløsning (eksempel 2) af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i
- 10 tabel 15.

TABEL 15. Resultater fra degummering af rårapssfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,9
0,58	149	5,4
1,0	91	5,3
2,0	13	5,4
3,5	11	5,3
5,0	13	5,4
6,0	10	5,2

EKSEMPEL 17

5

Degummering af rårapssfrø-spiseolie (II)

Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

Olie:

Rårapssfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01710, P-indhold 459 ppm.

15

Enzym:

Lecitase™ 10 L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

20

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700470, OD₂₈₀ = 0,8, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,45 mg/ml.

Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A

5 0,6 l (580 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (for eksempel 50 µl (ca. 500 U) til 1 mg enzym/kg olie) af Lecitase 10L (som er opnået fra Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 16.

10 TABEL 16. Resultater fra degummering af råapsfrøolie med Lecitase

Tid (timer)	1 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	2 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	3 mg Lecitase /kg olie P(ppm)
0	459	459	459
0,50	251	235	248
0,58	202	194	202
1,0	181	186	183
2,0	165	156	107
3,5	111	66	11
5,0	52	12	12
6,0	20	5	9

Forsøg B

15 0,6 l (581 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,0. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1,6 mg enzym/kg olie og 3,2 mg enzym/kg olie) af en oprenset opløsning af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 17.

20

TABEL 17. Resultater fra degummering af rårapssfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	1,6 mg <i>Fusarium</i> /kg olie, P(ppm)	3,2 mg <i>Fusarium</i> /kg olie, P(ppm)
0	459	459
0,50	236	208
0,58	193	173
1,0	109	96
2,0	9	7
3,5	9	8
5,0	9	9
6,0	9	9

Sammenfattet viser resultaterne:

5

Lecitase, 60 °C, pH 5,5

Enzymdosen blev varieret fra 1,0 til 3,0 mg/kg olie. Resultaterne er vist i tabel 16 ovenfor. Ved en enzymdosis på 1,0 mg/kg olie var degummering langsom og gav ca. 20 ppm efter 6 timer. Med de høje enzymdoser blev degummerings-ydeevnen forbedret til opnåelse af et phosphorindhold på 10 ppm efter ca. 3,5 timer med 3,0 mg enzym/kg olie.

10

Det formodes, at ydeevnen vil forbedres yderligere, hvis der anvendes højere enzymdoser.

15

F. oxysporum PL, 45 °C, pH 5,0

Enzymdoseme 1,6 og 3,2 mg/kg olie blev testet, og ydeevnen viste sig at være lige god (tabel 17 ovenfor). Med 1,6 mg enzym/kg olie - eller muligvis mindre - observeredes fortræffelig degummering, som gav 9 ppm P efter ca. 2 timer. Det forventes, at det er muligt at anvende endnu lavere mængder af *F. oxysporum*-phospholipase (for eksempel 0,9 mg/kg olie) og stadig opnå god degummerings-ydeevne.

20

EKSEMPEL 18Degummering af vanddegummeret spiseolie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, der er opnået fra *Fusarium culmorum*

5

Der blev udført et forsøg ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

10

Vanddegummeret rapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00730/B01700, P-indhold 231 ppm.

Enzym:

15

Et fermenteringsmedium fra *Fusarium culmorum*.

En *Fusarium culmorum*-stamme blev dyrket og centrifugeret, og supernatanten blev oprenset som beskrevet nedenfor.

20

Podekulturer af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 (deponeringsdato den 25. oktober 1994) blev frembragt i 500 ml-rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende sammensætning:

Majsudblødningsvæske (tørret)	12 g/l
Glucose	24 g/l

25

Til hver kolbe tilsættes 0,5 g CaCO₃ og 0,5 ml olie. pH justeres til 5,5 før autoklavering.

30

Efter 3 dage ved 26 °C og 250 rpm blev 5 ml af hver af podekulturene podet i rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende medium:

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Peptidase, Sheffield Products	4 g/l
Gærekstrakt, Difco 0127	3 g/l
Kødekstrakt, Difco 0126	1,5 g/l
Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olivenolie, Sigma	10 g/l

35

pH justeres til 7,3-7,4 før autoklavering.

5 Dyrkning fandt sted i 9 dage ved 26 °C og 250 rpm. Medieme blev centrifugeret og filtreret (0,45 µm) og supernatanterne opsamlet og anvendt til degummeringsforsøgene, der er vist nedenfor.

Æstimeret aktivitet 200 PHLU/ml.

10 Forsøg: Enzymatisk degummering af en vanddegummet olie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, som er opnået fra *Fusarium culmorum*

15 0,6 l (581 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,5. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1070 PHLU/kg olie) af en oprenset opløsning af phospholipase fra *F. culmorum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 18.

20 TABEL 18. Resultater fra degummering af råapsfrøolie med phospholipase fra *F. culmorum*

Tid (timer)	1070 U <i>F. culmorum</i> /kg olie P(ppm)
0	254
0,50	-
0,58	213
1,0	137
2,0	61
3,5	9
5,0	8
6,0	7

EKSEMPEL 19**Enzymatisk degummering af råolie ved anvendelse af Degomma VOD****5 Olie:**

Rårapssfrøolie C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Enzym:

10 En kommerciel tilgængelig phospholipase Degomma VOD (Röhm, Tyskland),
æstimeret koncentration 10 mg/ml.

15 0,6 l (581 g) rårapssfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 50 °C. Til t = 30
minutter tilsættes 0,714 ml (2,86 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH
på ca. 4,5. til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 3,6
mg/kg olie eller 7,1 mg/kg olie) af en oprenset opløsning af Degomma VOD-
phospholipase. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er
vist i tabel 19.

TABEL 19

Tid	3,6 mg/kg olie	7,1 mg/kg olie
0	276	273
0,50	216	253
0,58	210	246
1,0	127	94
2,0	45	16
3,5	15	7
5,0	15	10
6,0	14	10

20

Dette eksempel viser, at Degomma VOD er i stand til at degummere en
spiseolie. For at opnå en tilfredsstillende degummering af nævnte olie kræves
imidtildt relativt høje doser af Degomma VOD sammenlignet med *Fusarium*-
phospholipasen ifølge opfindelsen. Se for eksempel eksemplerne 16 og 17 til

sammenligning.

EKSEMPEL 20

- 5 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et brødforbedrende middel

Materialer og metoder

- 10 Fremstilling af brød

Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

15	<u>Grundopskrift</u>	
	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
	Gær	4 %
	Salt	1,5 %
20	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
25	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
30	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
	Hævning (32 °C, 82 % RH)	
	Kuvertbrød:	45 min.
35	Formbrød:	55 min.
	Bagning (230 °C)	
	Kuvertbrød:	22 min.

Formbrød: 35 min.

Vurdering af dej og bagte produkter

- 5 Egenskaberne for dejen og de bagte produkter blev bestemt som følger:

10 Specifikt volumen-indeks: Volumen af et brød eller et kuvertbrød måles ved hjælp af den traditionelle rapsfrø-fortrængningsmetode. Det specifikke volumen beregnes som volumen ml pr. g brød. Det specifikke volumen af kontrollen (uden enzym) defineres som 100. Det relative specifikke volumen-indeks beregnes som:

$$\text{Specifikt volumen-indeks} = \frac{\text{brødets specifikke volumen}}{\text{specifik volumen af kontrolbrød}} \times 100$$

15

Dejens klæbetilbøjelighed vurderes manuelt i overensstemmelse med følgende skala:

20	Kuvertbrødform:	meget flad	1
		flad	2
		normal	3
		god/rund	4
		meget god	5
		for rund	6
25			
30			
35			

RESULTATER

TABEL 20

Enzym/ additiv								
A)					1	1	1	1
B)		500	1500	3000		500	1500	3000
C)	100	110	106	93	99	111	116	108
D)	100	106	99	94	102	107	109	103
E)	3	4	4	3	3	4	5	4,5

A) Lecimulthin 100 (g/kg mel)

B) F.o.-phospholipase (LU/kg mel)

C) Specifikt volumen-indeks (kuvertbrød)

D) Specifikt volumen-indeks (formbrød)

E) Kuvertbrødform (score)

5

10 Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Resultaterne viser en klar volumenforøgende effekt af *Fusarium oxysporum*-phospholipase på både kuvertbrød og formbrød ved opskriften, som ikke indeholder lecithin. Hvis lecithin indbefattes i opskriften, opnås endnu bedre volumeneffekter, selvom lecithin ikke selv bidrager til volumen. En statistisk analyse (ANOVA, $\alpha = 0,05$), som blev udført i Statgraphics Plus, release 3.0, viser en signifikant positiv synergi mellem phospholipasen og lecithinen.

15

Både med og uden lecithin i opskriften opnås en betydeligt forbedret form af kuvertbrød med *F. oxysporum*-phospholipasen. I dette eksempel opnåedes den bedste kuvertbrødform ved en blanding af lecithin og phospholipase (1500 LU/kg mel).

20

EKSEMPEL 21

25

Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et anti-friskhedstabende middel

Materialer og metoderFremstilling af brød

- 5 Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

	<u>Grundopskrift</u>	
	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
10	Gær	5 %
	Salt	1,5 %
	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm
15	<u>Bageprocedure</u>	
	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
20	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
25	Hævning (32 °C, 82 % RH)	55 min.
	Bagning (230 °C)	35 min.

- 30 I dette eksempel blev brødene anbragt i forme med låg for at undgå forskelle i de specifikke volumener før strukturanalyse. Efter nedkøling blev brødene opbevaret ved stuetemperatur, pakket i plastikposer.

Vurdering af bagte produkter

Vurdering af friskhedstab og struktur kan udføres ifølge AACC-metoden 74-09.

En vurdering af brødkrummers blødhed som indikator for brøds friskhedstab blev udført 0, 1, 3 og 7 dage efter bagning i overensstemmelse med følgende procedure:

En skive brød blev komprimeret ved konstant hastighed i en strukturanalyse (TA TX-2), og styrken af kompressionen blev målt i g. Krummens fasthed måles som styrken ved 25 % kompression. En brødkrummes fasthed stiger efterhånden som brødet mister friskhed.

Resultater

Resultaterne fra fasthedsmålinger som funktion af opbevaringsdage er vist i tabel 21. Lecimulthin blev tilsat i en koncentration på 1 g/kg mel, og *Fusarium oxysporum*-phospholipasen blev tilsat i en dosis på 500 U/kg mel. Hvert resultat i tabellen er gennemsnitsværdien for 6 målinger (2 brød, 3 målinger på hver).

TABEL 21

Enzym/additiv	Fasthed Dag 0	Fasthed Dag 1	Fasthed Dag 3	Fasthed Dag 7
Kontrol	223	350	631	1061
Lecimulthin 100*	225	261	532	1010
Phospholipase	201	303	573	1257
Lecimulthin 100* + phospholipase	169	304	468	834

*Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Som det fremgår af tabel 21, var brødene, der var behandlet med phospholipase, lidt blødere end kontrollen op til 3 dages opbevaring. I kombination med lecithin kunne der opnås en betydelig anti-friskhedstabende effekt under hele opbevaringen (som ikke er opnåelig med lecithin eller phospholipase alene).

SEKVENSLISTE

5 SEQ ID NO: 1 viser en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som omfatter en DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 1

- 10 (i) SEKVENSEGENSKABER:
 (A) LÆNGDE: 1170 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHED: enkeltstrenget
 (D) TOPOLOGI: lineær
- 15 (ii) MOLEKYLETYPE: cDNA
- (vi) NATURLIG OPRINDELSE:
 (A) ORGANISME: *Fusarium oxysporum*
 (B) STAMME: DSM 2672
- 20 (ix) EGENSKAB:
 (A) NAVN/KODE: CDS
 (B) PLACERING: 23..1063
- 25 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1

```

TTGGAGAATA TTGCTTGTCG CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG GCC ATC      52
                Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile
                  1             5             10

ACC CTC GCG GTA CCC ACT CCT GTA GCT CTC GAC GAC TAC GTC AAC TCT      100
Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser
              15             20             25

CTT CAG CAG CCA GCT GTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC ACC AAC TTC      148
Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe
              30             35             40

AAG TTC TAC ATC CAA CAC GCG GCC GCA GCT TAC TGC AAC TCT GAA GCC      196
Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala

```

30

35

45	50	55	
GCA GGT GGT TCC AAG ATC ACC TGC TCC AAC AAT GGC TGT CCA ACC GTT			244
Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val			
60	65	70	
CAG GGC AAC GGA GCG ACC ATC GTC ACA TCT TTC GTT GGC TCC AAG ACA			292
Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr			
75	80	85	90
GGT ATC GGT GGC TAC GTC GCG ACA GAC TCT GCC CGA AAG GAA ATC GTC			340
Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val			
95	100	105	
CTC TCG TTC CGC GGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TCG CTT ACC AAC CTC			388
Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu			
110	115	120	
GAC TTC GGC CAG GAA GAC TGC AGT CTC GTC TCT CGA TGC GGT GTG CAC			436
Asp Phe Gly Gln Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His			
125	130	135	
TCT GGC TTC CAG CGA GGC TGC AAT GAA ATC TCG TCT CGA GCA ACC GCT			484
Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala			
140	145	150	
GCT GTT GCC TCC GCC GCG AAG GCG AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT			532
Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser			
155	160	165	170
ACA GGC CAC TCC CTT CGA GGT GCC GTC GCC GTT CTT GCT GCC GCA AAC			580
Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn			
175	180	185	
TTC AGA GTC GGT GGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GCC TCT CCC			628
Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro			
190	195	200	
CGT GTC GGA AAC GCG CAG CTC TCA GCC TTC GTC TCA AAC CAG GCT GGT			676
Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly			
205	210	215	
GGA GAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT			724
Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro			
220	225	230	

CCT CTG ATC TTC GGA TAC AGG CAC ACA ACT CCT GAG TTC TGG CTG TCC Pro Leu Ile Phe Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser 235 240 245 250	772
GCC GGT GGA GGC GAC AAG GTT GAC TAC ACC ATC AGC GAT GTC AAG GTC Gly Gly Gly Gly Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val 255 260 265	820
TGT CAG GGT GCT GCC AAG CTT GGA TCC AAC GGT GGA ACT CTT GGT TTG Cys Glu Gly Ala Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu 270 275 280	868
GAT ATT CCT CCT CAT CTG CAT TAC TTC CAG GCG ACT GAC GCC TGT AAC Asp Ile Ala Ala His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn 285 290 295	916
GCT GGT GGC TTC TCT TGG CGA CGA TAC AGA AGC GCC GAG AGC GTC GAC Ala Gly Gly Phe Ser Trp Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp 300 305 310	964
AAG AGG GCC ACC ATG ACT GAT GCC GAG CTT GAG AAG AAG CTG AAC TCT Lys Arg Ala Thr Met Thr Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser 315 320 325 330	1012
TAT GTC CAG ATG GAT AAG GAG TAT GTG AAG AAT AAC CAG GCC CGC TCT Tyr Val Gln Met Asp Lys Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser 335 340 345	1060
TAA CGAGGTATG AGCTTTCATG GGAAATGACA TCATTCATGA ACCAAACCAT	1113
AGTACATATG ATGCAATAG GATATAAAAA CATATTTTCAT TCCTAGCTT TACACAA	1170

5 SEQ ID NO: 2 viser aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 2

- | | | |
|----|------|----------------------------------|
| 10 | (i) | SEKVENSEGENSKABER: |
| | (A) | LÆNGDE: 346 aminosyrer |
| | (B) | TYPE: aminosyre |
| | (D) | TOPOLOGI: lineær |
| 15 | (ii) | MOLEKYLETYPE: protein |
| | (xi) | SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2 |

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15

Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30

Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
 50 55 60

Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
 65 70 75 80

Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95

Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
 100 105 110

Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
 115 120 125

Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140

Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
 145 150 155 160

Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly

165	170	175
Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr		
180	185	190
Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln		
195	200	205
Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr		
210	215	220
His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr		
225	230	235 240
Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Lys		
245	250	255
Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn		
260	265	270
Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu		
275	280	285
His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp		
290	295	300
Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr		
305	310	315 320
Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys		
325	330	335
Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser		
340	345	

Patentkrav:

1. Polypeptid, som fremviser phospholipase A-aktivitet, der er valgt fra gruppen, som består af:
- 5
- (a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,
- 10
- (b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
- (c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og
- 15
- (d) et polypeptid, der er mindst 70 % homologt med polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c).
2. Polypeptid ifølge krav 1, som er en phospholipase A1.
- 20
3. Polynukleotid, som omfatter en sekvens, der er valgt fra gruppen, som består af:
- (a) den phospholipase A-kodende sekvens, der er klonet ind i plasmid pYES
- 25
- 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,
- (b) nukleotiderne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,
- (c) nukleotiderne 113-1063 i SEQ ID NO: 1,
- 30
- (d) nukleotiderne 113-931 i SEQ ID NO: 1,
- (e) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
- 35
- (f) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og
- (g) et polynukleotid, der er mindst 70 % homologt med et hvilket som helst

af ovennævnte polynukleotider, hvor polynukleotidet koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase A-aktivitet.

5

4. Polynukleotid ifølge krav 3, der koder for et phospholipase A1-polypeptid.

5. Vektor, som omfatter polynukleotidet ifølge krav 3 eller 4.

6. Værtscelle, som omfatter vektoren ifølge krav 5.

10

7. Værtscelle ifølge krav 6, som er en eukaryotcelle, især en svampecelle, såsom en trådsvampecelle, for eksempel *Aspergillus* eller *Fusarium*.

8. Fremgangsmåde til frembringelse af en phospholipase A, som omfatter:

15

(a) dyrkning af værtscellen ifølge krav 6 eller 7 under betingelser, der er passende til ekspression af phospholipasen og

(b) indvinding af phospholipasen.

20

9. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces, som omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtacylgrupper.

25

10. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, der har et phosphorindhold fra 50-250 ppm, som omfatter behandling af olien med polypeptidet til hydrolysering af en stor del af phospholipidet og separering af en vandfase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid, fra olien.

30

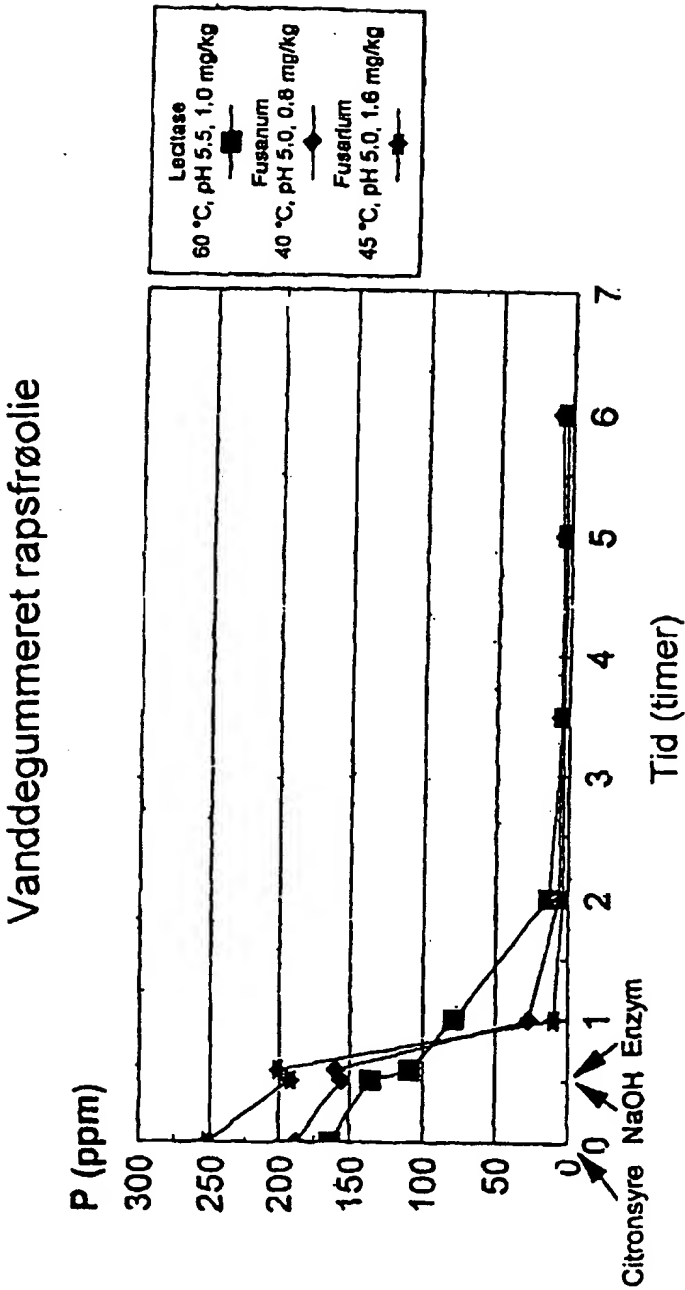
11. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til frembringelse af et bagt produkt, som omfatter tilsætning af polypeptidet til en dej og bagning af dejen til frembringelse af det bagte produkt.

35

F.oxy sporum	1	-MLLCLPLLSATITLAVASPVA-LDDYVNSLEERA	31
F.heterosporum	1	MMLVLSSLILAFATAAGPVPSVDENTRVLHRA	33
F.oxy sporum	32	VGVTTTDDFSNFKFYLQHGAAYCNSSEAAAGSKI	64
F.heterosporum	34	VTVTTTODLSNFRFYLOHADAAAYCNFNTAVGKPV	66
F.oxy sporum	65	TCSNNGCPPTVQGNQATIVTSFFVGSKTGIGGYVA	97
F.heterosporum	67	HCSAGNCPCDIEKDAALVVGSVVGTKTGIGAYVA	99
F.oxy sporum	98	TDSARKEI VVS FRGSINIRNWLTNLDFGQECCS	130
F.heterosporum	100	TDNARKEI VVS VRGSINVRNWITNFNFGCKTCID	132
F.oxy sporum	131	LVS GCGVHS GFORAWN EISSQATAA AVASARKAN	163
F.heterosporum	133	LVA GCGVHTGF L DAWEEVA ANVKAAVS AKTAN	165
F.oxy sporum	164	PSFINVISITGHSLGGAVAVALAAANLRVGGTPVDOI	196
F.heterosporum	166	PTEFKFVVTGHSLGGAVATIAAAYLRKDGFPFDL	198
F.oxy sporum	197	YTYGSPRVGNIAQLSAFVSNQA GG EYRVTHADDP	229
F.heterosporum	199	YTYGSPRVGNDFFANFVTOQTGTGA EYRVTHGDDP	231
F.oxy sporum	230	VPRLPPLLIFGYRHTTPFEFWLSGGGGDKVDYTIS	262
F.heterosporum	232	VPRLPPLIVEGYRHTSP EYWLN GG PLOK-DYTVT	263
F.oxy sporum	263	DVKVCEGAANLGCNGGTLGLDTIA AHLHYFQATD	295
F.heterosporum	264	EIKVCEGIANVMCNGGTIGLDILAHI TTFQSMA	296
F.oxy sporum	296	ACNAGGFSWRRIYRSAESVDKRATMTDAELEKKL	328
F.heterosporum	297	TCAPIAI PWKR-----DMSD EELEKKL	316
F.oxy sporum	329	NSYVQMOKKEYVKNNQARS	346
F.heterosporum	316	TCYS EMDQEFVKQMI---	333

Fig. 1

Fig. 2 Oliedegummering - *Fusarium* PL vs. Lecitase



TELEFAX 1 SIDE
HASTER

Patent- og Varemærkestyrelsen
Helgeshøj Allé 81
2630 Tåstrup

19 December 2002

Att.: Kassen

Deres ref: -
Vor ref: 4798.202-EP

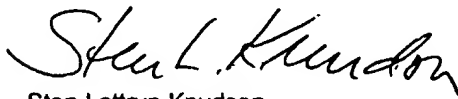
DK/EP oversættelse vedrørende EP patent 0869167
Trykningsgebyr

Vi skal hermed anmode om at trykningsgebyret for ovennævnte patent trækkes på kontonr. PDK
1.

NB

→ Vi beder Dem venligst bekræfte modtagelsen af dette brev pr. fax. På forhånd tak.

Med venlig hilsen
Novozymes A/S


Sten Lottrup Knudsen
Patents

Novozymes A/S
Patents

Krogshøjvej 36
DK-2880 Bagsvaerd
Denmark

Telephone:
+45 8824 9999
Telefax:
+45 4442 6080

Internet:
www.novozymes.com

CVR number:
10 00 71 27

NZAS-0007559

19. DEC 2002

msf

DK/EP

Please return this copy



Patent- og
Varemærkestyrelsen
Erhvervsministeriet

oversættelse vedrørende EP patentansøgning / EP patent

Reference	Country
Agent	Spørgsmål
Trykningsgebyr:	Ansøgers/fuldmægtigs referencenr.:
7.390,-	4798,202-EP/DK
Action	Term
SLK	-

Helgesvej Allé 81
2630 Taastrup

Tlf. 43 50 80 00
Fax 43 50 80 01
Postgiro 8 989 923
E-post pvs@dkpto.dk
www.dkpto.dk

Ansøger (fulde navn og adresse):

☐ Flere ansøgere på bagsiden.

NOVOZYMES A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

SLK 19 DEC 2002

Fuldmægtig (navn og adresse):

Dansk benævnelse:

REDUKTION AF PHOSPHOR-INDHOLDENDE BESTANDDELE I
SPISEOLIER; SOM OMFATTER EN STOR MÆNGDE IKKE-HYDRERBART
PHOSPHOR; VED ANVENDELSE AF EN PHOSPHOLIPASE, EN PHOS-
PHOLIPASE FRA EN TRÅDSVAMP, DER HAR EN PHOSPHOLIPASE
A OG/ELLER B AKTIVITET.

Bilagsfortegnelse:

- ☐ Dansk oversættelse af krav (71) i 2 ekpl.
☐ Rettet dansk oversættelse af krav (72) i 2 ekpl.
☒ Dansk oversættelse af patent (73)
☐ Dansk oversættelse af ændret patent (74)
☐ Rettet dansk oversættelse af patent (75)
☒ Tegning
☐ Fuldmagt

Dato og underskrift: Bagsværd, 17. december 2002
Novozymes A/S

Sten Lottrup Knudsen

EP ansøgningsnummer: 97 610 056.0

EP publiceringsnummer: 0869167

EP patentnummer: 0869167

10.1-mar00/b

NZAS-0007560

DK/EP

oversættelse vedrørende EP patentansøgning / EP patent



Patent- og
Varemærkestyrelsen
Erhvervsministeriet

Helgeshøj Allé 81
2630 Taastrup

Trykningsgebyr:

7.390,-

Ansøgers/fuldmægtigs referencenr.:

4798,202-EP/DK

TH. 43 50 80 00

Fax 43 50 80 01

Postgiro 8 989 923

E-post pvs@dkpto.dk

www.dkpto.dk

Ansøger (fulde navn og adresse):

☐ Flere ansøgere på bagsiden.

NOVOZYMES A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

Fuldmægtig (navn og adresse):

Dansk benævnelse:

REDUKTION AF PHOSPHOR-INDHOLDENDE BESTANDDELE I
SPISEOLIER; SOM OMFATTER EN STOR MÆNGDE IKKE-HYDRERBART
PHOSPHOR; VED ANVENDELSE AF EN PHOSPHOLIPASE, EN PHOS-
PHOLIPASE FRA EN TRÅDSVAMP, DER HAR EN PHOSPHOLIPASE
A OG/ELLER B AKTIVITET.

Bilagssortegnelse:

- ☐ Dansk oversættelse af krav (71) i 2 ekpl.
☐ Rettet dansk oversættelse af krav (72) i 2 ekpl.
☒ Dansk oversættelse af patent (73)
☐ Dansk oversættelse af ændret patent (74)
☐ Rettet dansk oversættelse af patent (75)
☒ Tegning
☐ Fuldmagt

Dato og underskrift: Bagsværd, 17. december 2002
Novozymes A/S

Søren Lottrup Knudsen

EP ansøgningsnummer: 97 610 056.0

EP publiceringsnummer: 0869167

EP patentnummer: 0869167

10.1-mar00/s

NZAS-0007561

Reduktion af phosphor-indeholdende bestanddele i spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase, en phospholipase fra en trådsvamp, der har phospholipase A og/eller B aktivitet.

Opfindelsens område

5 Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til reduktion af indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor, ved anvendelse af en phospholipase.

10 Den foreliggende opfindelse angår yderligere et enzym med phospholipase-aktivitet, en klonet DNA-sekvens, der koder for enzymet med phospholipase-aktivitet, en fremgangsmåde til frembringelse af enzymet og anvendelse af nævnte enzym til en række industrielle formål.

Opfindelsens baggrund

15 Enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en relativ stor mængde ikke-hydrerbart phosphorindhold

20 Anvendelsen af phospholipase til enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm) til at reducere phosphorindholdet i nævnte vanddegummeret spiseolie er velkendt.

25 Denne proces kan imidlertid forbedres yderligere, især til udførelse af enzymatisk degummering af spiseolier, som omfatter en stor mængde ikke-hydrerbart phosphor (NHP) og/eller relativt store mængder af mucilago.

Følgelig er et formål for opfindelsen at tilvejebringe en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i sådanne olier, hvor nævnte fremgangsmåde omfatter anvendelse af en phospholipase.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen

35 Phospholipider, såsom lecithin eller phosphatidylcholin, består af glycerol, der er esterificeret med to fedtsyrer i den ydre (sn-1) og den midterste (sn-2) position og esterificeret med phosphorsyre i den tredje position; phosphorsyren igen kan være esterificeret til en aminoalkohol. Phospholipaser er enzymer, der tager del i hydrolysen af phospholipider. Adskillige typer af phospholipase-aktivitet kan skelnes fra hinanden, herunder phospholipaserne

A₁ (PLA₁) og A₂ (PLA₂), som hydrolyserer én fedtsyregruppe (i henholdsvis sn-1- og sn-2-positionen) til frembringelse af lysophospholipid, og lysophospholipase (eller phospholipase B (PLB)), som kan hydrolysere den resterende fedtsyregruppe i lysophospholipid.

5

Denne opfindelse angår blandt andet en phospholipase fra en trådsvamp, som har evnen til at hydrolysere den ene og/eller begge fedtsyregrupper i et phospholipid (det vil sige fremviser PLA- og/eller PLB-aktivitet).

10

Tidligere karakteriserede PLA- og/eller PLB-enzymmer fra svampe

Talrige referencer beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser. For at gøre det lettere at få et overblik over status inden for området, er referencerne blevet grupperet i to afsnit.

15

Afsnit ét vedrører referencer, som beskriver identificeringen af svampe-phospholipaser, som man aktuelt ikke mener er beslægtede med svampe-phospholipasen ifølge den foreliggende opfindelse. Disse referencer er hovedsageligt indbefattet for at sammenfatte status inden for området karakterisering af svampe-phospholipaser.

20

Afsnit to vedrører referencer, som beskriver karakteriseringen af svampe-phospholipaser, som menes at være relevante for svampe-phospholipaserne ifølge den foreliggende opfindelse.

25

Afsnit ét

Enzymer med phospholipase A- og/eller B-aktivitet er blevet fundet i forskellige svampekilder, herunder *Penicillium notatum* (der også er kendt som *P. chrysogenum*; N. Kawasaki, J. Biochem. 77:1233-44, 1975; N. Masuda et al., Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991), *P. cyclopium* (Process Biochemistry 30(5):393-401, 1995), *Saccharomyces cerevisiae* (M. Ichimasa et al., Agric. Biol. Chem. 49(4):1083-89, 1985; F. Paultauf et al., J. Biol. Chem. 269:19725-30, 1994), *Torulaspora delbrueckii* (gammelt navn *Saccharomyces rosei*; Y. Kuwabara, Agric. Biol. Chem. 52(10):2451-58, 1988; FEMS, Microbiol. Letters 124:29-34), *Schizosaccharomyces pombe* (H. Oishi et al., Biosci. Biotech. Biochem. 60(7):1087-92, 1996), *Aspergillus niger* (Technical Bulletin, G-

30

35

zyme™ G999, Enzyme Bio-Systems Ltd.; Process Biochemistry 30(5):393-401 (1995)) og *Corticium centrifugum* (S. Uehara et al., Agric. Biol. Chem. 43(3):517-525, 1979).

5 Afsnit to

EP 575133 A2 beskriver isoleringen og karakteriseringen af en svampe-phospholipase A1, som er opnået fra *Aspergillus*, og anvendelsen deraf til industrielle formål.

10

Der er ingen sekvensinformation (hverken DNA- eller aminosyre-) indbefattet i ansøgningen, ej heller er nogen strategi eller noget forslag til kloning af noget af *Aspergillus*-phospholipasen beskrevet eller anført i ansøgningen.

15

Tsung-Che et al. (Phytopathological notes 58:1437-38 (1968)) beskriver kort karakteriseringen af en phospholipase fra *Fusarium solani*.

20

EP 130 064 beskriver en isoleret fraktion af et fermenteringsmedium, der fremviser lipase-aktivitet, som er opnået fra stammen *Fusarium oxysporum* DSM 2672. Ydermere er anvendelsen deraf i detergentsammensætninger beskrevet. EP 130 064 beskriver imidlertid ikke denne fraktion som fremvisende phospholipase-aktivitet.

25

WO 96/13579 beskriver en lipase, som er opnået fra stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94, herunder dens N-terminale sekvens.

WO 96/13579 beskriver imidlertid ikke noget enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

30

En cDNA-sekvens, som koder for en lipase fra *Fusarium heterosporum* er beskrevet (Cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding a lipase from *Fusarium heterosporum*, J. Biochem. 116:536-540, 1994). Denne sekvens menes aktuelt at være den DNA-sekvens, der er mest beslægtet med en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)). Denne reference beskriver imidlertid

35

ikke noget enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet.

En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne klonede DNA-sekvens har imidlertid meget begrænset homologi med en DNA-sekvens ifølge opfindelsen (se afsnittet "Sammenligning med tidligere kendt materiale" (se nedenfor)).

Industriel anvendelse af phospholipaser

En række anvendelser af phospholipaser er kendte, såsom anvendelse af phospholipase i for eksempel enzymatisk degummering af en vanddegummeret olie (US 5 264 367, Metallgesellschaft, Röhm), behandling af stivelseshydrolysat (især fra hvedestivelse) til forbedring af filtrerbarheden (EP 219 269, CPC International), som tilsætningsstof til brøddej til at forbedre brødets elasticitet (US 4 567 046, Kyowa Hakko), og til fremstilling af lysolecithin med specielle emulgerende egenskaber.

Aktuelt anvendes phospholipasen Lecitase® (Novo Nordisk A/S) kommercielt til for eksempel degummering af olier. Lecitase® er et mammalia-enzym, som er opnået fra svinepancreas.

Det er velkendt, at det er muligt at danne svampeenzymer rekombinant med opnåelse af industrielt økonomisk acceptabel udbytte, især fra trådsvampe.

Følgelig er det et formål for denne opfindelse at tilvejebringe en forbedret phospholipase til anvendelse for eksempel i processerne, der er beskrevet ovenfor.

Det er endvidere et formål for den foreliggende opfindelse at beskrive processer og fremgangsmåder til rekombinant produktion med industrielt acceptabel udbytte af en phospholipase, som er opnået fra en trådsvamp.

Sammendrag af opfindelsen

Vanddegummering af spiseolier udføres ved hjælp af ekstraktion med vand. Ved denne behandling efterlades en del af fosfatiderne i olien. Denne del beskrives ved hjælp af fællesbetegnelsen "ikke-hydrerbare fosfatider" (NHP). Ved produktionen af olier er det essentielt at fjerne NHP-indholdet (US

5 264 367).

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i en olie, som omfatter en relativ stor mængde af NHP.

5

Følgeligt angår opfindelsen i et første aspekt en fremgangsmåde til at reducere indholdet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som har et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, der er målt ved hjælp af:

10

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

15

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

20

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer, og

25

vi) herefter udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien,

og hvor nævnte fremgangsmåde omfatter:

30

kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5-8 og en vandig opløsning af en phospholipase A1, en phospholipase A2 eller en phospholipase B, idet opløsningen emulgeres i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

35

I et andet aspekt angår opfindelsen en ny klonet phospholipase.

Yderligere undersøgelser af karakteren af lipase-aktiviteten, som findes i *Fusarium oxysporum* DSM 2672 (og er beskrevet i EP 130 064), viste, at den isolerede fraktion omfatter adskillige bestanddele med lipase-aktivitet, hvoraf den ene fremviste phospholipase-aktivitet.

På trods af en række tekniske vanskeligheder (se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klonet et enzym, som fremviser phospholipase A-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, mere specifikt *Fusarium oxysporum*.

Dette er første gang en phospholipase A fra en trådsvamp er blevet klonet, og følgelig tilvejebringer den foreliggende opfindelse en klonet DNA-sekvens, som koder for et phospholipase A-enzym fra en trådsvamp.

Følgelig angår ét aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, som koder for et polypeptid med phospholipase A-aktivitet, hvor DNA-sekvensen er opnået fra en trådsvamp.

En cDNA-sekvens, som koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum*, er beskrevet i Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991.

Denne DNA-sekvens fremviser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og endvidere varierer en fysiologisk egenskab, såsom molekylemassen, betydeligt mellem nævnte PLB fra *P. notatum* (66 kDa) og en phospholipase ifølge opfindelsen (29 ± 10 kDa (se nedenfor)).

Endvidere har en sammenligning med kendte nukleotid- og aminosyresekvenser vist, at DNA-sekvensen og/eller den tilsvarende kodede aminosyresekvens ifølge opfindelsen kun har ringe homologi med alle kendte DNA- og/eller aminosyresekvenser (se nedenfor).

Følgelig mener man aktuelt, at DNA-sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning, vil være meget værdifuld til for eksempel kloning af en anden beslægtet/homolog phospholipase-kodende DNA-sekvens, da en specifik hybridiseringsprobe og/eller PCR-primere nu let kan konstrueres på

basis af nævnte DNA-sekvens ifølge opfindelsen.

5 Yderligere mener man aktuelt, at det er muligt at klonе både en
beslægtet/homolog phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-
sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den
foreliggende ansøgning.

10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt en klonet DNA-sekvens, som
koder for et enzym, der fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-
aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

- (a) den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet
ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,
- 15 (b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,
mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere
fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1, eller den komplementære
streng dertil,
- 20 (c) en DNA-sekvens, der er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-
sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),
- (d) en DNA-sekvens, der er defineret i (a) eller (b), som koder for et
polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog
25 med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,
eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er
vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,
- 30 (e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-
probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ
ID NO: 1, ved lav stringens,
- 35 (f) en DNA-sekvens, som koder for et polypeptid, der har de samme
aminoesyresekvenser i positionresterne 1 til 346, 31 til 303 eller 31 til 303 i SEQ
ID NO: 2, eller aminoesyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken
som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

(g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specificeret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).

5 Endvidere er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet grundigt karakteriseret, og det har vist sig, at den har phospholipase-aktivitet ved lavt pH, denne egenskab gør den meget egnet til anvendelse til oliedegummering. Phospholipasen er ikke membranbundet, hvilket gør den egnet til kommerciel produktion og oprensning.

10 Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

- 15 i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,
- ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,
- iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,
- 20 iv) et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller
- v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C.

25 En udledt aminosyresekvens for en isoleret phospholipase ifølge opfindelsen er vist i SEQ ID NO: 2.

30 Den N-terminale aminosyresekvens for en moden secerneret isoleret phospholipase er blevet bestemt. Nævnte N-terminale sekvens viste, at den modne del af en phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, starter i aminosyre nr. 31 i SEQ ID NO: 2. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

35 Endvidere er den C-terminale sekvens for en aktiv secerneret phospholipase ifølge opfindelsen med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, blevet bestemt. Nævnte C-terminal-bestemte phospholipase blev rekombinant

udtrykt i trådsvampestammen *Aspergillus oryzae*. Se forsøgseksempel heri for yderligere henvisning.

Disse resultater viste, at enzymet blev C-terminalt processeret under
 5 ekspresion fra *A. oryzae*, og resultaterne tyder på, at Ser303 i SEQ ID NO: 2 er den mest sandsynlige C-terminale rest i det udtrykte modne aktive enzym. Det forudses imidlertid, at endnu yderligere C-terminal processering kan finde sted (det vil sige, som frembringer et fragment af nævnte sekvenser), og at man stadig har et udtrykt modent aktivt enzym.

10

Følgeligt angår opfindelsen i et yderligere aspekt et isoleret enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller B-aktivitet og er valgt fra gruppe, der omfatter:

15

(a) et polypeptid, som kodes af den phospholipase A- og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

20

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

25

(d) en analog til polypeptider, der er defineret i (a), (b) eller (c), idet analogen er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

(e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

30

I endnu et yderligere aspekt tilvejebringer opfindelsen en rekombinant ekspresionsvektor, som åbner mulighed for heterolog rekombinant produktion af et enzym ifølge opfindelsen. Det er derved muligt at lave en stærkt oprenet phospholipase-sammensætning, som er kendetegnet ved at være fri for homologe urenheder. Det er yderst fordelagtigt til en række industrielle
 35 anvendelser.

Den foreliggende opfindelse viser eksperimentelt (se nedenfor), at en

phospholipase, der er opnået fra en stamme af *Fusarium culmorum* og *Fusarium oxysporum*, har forbedrede egenskaber til anvendelse til industrielle relevante formål. Det forudses, at phospholipaser, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, vil have forbedrede egenskaber, der er relevante til anvendelse til anvendelse til industrielle formål.

Følgeligt angår opfindelsen i endnu et yderligere aspekt anvendelsen af en phospholipase, der er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *Fusarium oxysporum*, i en proces, der omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtsyregrupperne.

Endelig angår opfindelsen en isoleret, i det væsentlige ren biologisk kultur af *Escherichia coli*-stammen DSM 11299, som indeholder en phospholipase-kodende DNA-sekvens (den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299), der er opnået fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, eller en hvilket som helst mutant af nævnte *E. coli*-stamme, som har bevaret den phospholipase-kodende egenskab.

Homologisammenligning med kendte sekvenser

Der blev udført en homologisøgning med phospholipasen ifølge opfindelsen mod nukleotid- og proteindatabaser. Homologisøgningen viste, at den tættest beslægtede kendte sekvens var en lipase fra *Fusarium heterosporum* (en parallelstilling af aminosyrer er vist i figur 1).

DNA-sekvensen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 1, 23-1060), som koder for phospholipasen, viser kun 62 % DNA-homologi med den kendte lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum* (Genbank-databasereference S77816), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 60 % homologi med en udledt aminosyresekvens på basis af den kendte DNA-sekvens ovenfor (se figur 1).

Dette viser, at DNA- og/eller aminosyresekvensen for en phospholipase ifølge opfindelsen rent faktisk er forskellig fra alle kendte DNA- og/eller

aminosyresekvenser.

En cDNA-sekvens, der koder for en phospholipase B fra *Penicillium notatum* er beskrevet (Eur. J. Biochem. 202:783-787, 1991). Denne DNA-sekvens (Genbank-databasereference X60348) viser imidlertid kun en meget begrænset DNA-lighed på 39 % med DNA-sekvensen ifølge den foreliggende opfindelse (SEQ ID NO: 1, 23-1060), og den tilsvarende aminosyresekvens for phospholipasen ifølge opfindelsen (SEQ ID NO: 2) viser kun 20 % lighed med en udledt aminosyresekvens, der er baseret på den kendte PLB-DNA-sekvens ovenfor.

Beregningerne af homologi blev udført som beskrevet senere i denne specifikation.

15 Tegninger

Figur 1: Parallelopstilling af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2 med en kendt lipasesekvens fra *Fusarium heterosporum*.

20 Figur 2: Sammenligning af enzymatisk degummeringsevne hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen.

Definitioner

25 Før en mere detaljeret gennemgang af denne opfindelse vil følgende udtryk blive defineret.

30 "En klonet DNA-sekvens": Udtrykket "en klonet DNA-sekvens" henviser til en DNA-sekvens, der er klonet ifølge standard-kloningsprocedurer, som anvendes ved gensplejsning til at flytte et segment af DNA fra dens naturlige placering til et andet site, hvor det vil blive reproduceret. Kloningsprocessen inddrager udskæring og isolering af det ønskede DNA-segment, insertion af DNA-stykket i vektormolekylet og inkorporering af den rekombinante vektor i en celle, hvor talrige kopier eller kloner af DNA-segmentet vil blive replikeret.

35 Den "klonede DNA-sekvens" ifølge opfindelsen kan alternativt benævnes "en DNA-konstruktion", "et klonet polynukleotid med en DNA-sekvens" eller "en

isoleret DNA-sekvens".

5 "Opnået fra": Til formålet i den foreliggende opfindelse betyder udtrykket "opnået fra" som anvendt heri i forbindelse med en specifik mikrobiel kilde, at enzymet og følgelig DNA-sekvensen, der koder for nævnte enzym, er dannet af den specifikke kilde eller af en celle, hvori et gen fra kilden er blevet indsat.

10 "Et isoleret polypeptid": Som defineret heri henviser udtrykket "et isoleret polypeptid" eller "en isoleret phospholipase" som anvendt om phospholipasen ifølge opfindelsen til en phospholipase eller phospholipasedel, som i det væsentlige er fri for andre ikke-phospholipase-polypeptider, for eksempel mindst 20 % ren, fortrinsvis mindst 40 % ren, mere fortrinsvis 60 % ren, endnu mere fortrinsvis 80 % ren, mest fortrinsvis 90 % ren og endnu mest fortrinsvis 95 % ren, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE.

15 Når det isolerede polypeptid er mindst 60 % rent kan udtrykket "et stærkt isoleret polypeptid" anvendes. Det "isolerede polypeptid" kan alternativt benævnes "oprenset polypeptid".

20 "Homologe urenheder": Som anvendt heri betyder udtrykket "homologe urenheder" en hvilken som helst urenhed (for eksempel et andet polypeptid end enzymet ifølge opfindelsen), som stammer fra den homologe celle, hvorfra enzymet ifølge opfindelsen oprindeligt er opnået. I den foreliggende opfindelse kan den homologe celle for eksempel være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

25 "Phospholipase-kodende del": Som anvendt heri betyder udtrykket "phospholipase-kodende del", når det anvendes i forbindelse med en DNA-sekvens, det område af DNA-sekvensen, som svarer til det område, der er translateret til en polypeptidsekvens.

30 I DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, er det området mellem den første "ATG"-startkoden ("AUG"-kodon i mRNA) og den følgende stopkodon ("TAA", "TAG" eller "TGA").

35 Det translaterede polypeptid kan yderligere foruden den modne sekvens, som fremviser phospholipase-aktivitet, omfatte et N-terminalt signal og/eller en

propeptidsekvens. Signalsekvensen styrer almindeligvis sekretionen af polypeptidet, og propeptidet styrer almindeligvis foldningen af polypeptidet. For yderligere information se Egnell, P., et al., *Molecular Microbiol.* **6**(9):1115-19 (1992) eller Stryer, L., "Biochemistry", W.H. Freeman and Company/New York, ISBN 0-7167-1920-7.

5

"Modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens": Udtrykket "modifikation(er)", der anvendes i forbindelse med modifikation(er) af en DNA- og/eller aminosyresekvens som beskrevet heri, defineres til at indbefatte kemisk modificering såvel som genmanipulation(er). Modificeringen eller modificeringerne kan være substitution, deletion og/eller insertion i aminosyren eller aminosyrerne af interesse.

10

"Phospholipase A": Udtrykket "phospholipase A", som anvendes heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen, påtænkes at dække et enzym med phospholipase A1- og/eller phospholipase A2-aktivitet.

15

Phospholipase A1 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.32.

20

Officielt navn: phospholipase A1 (PLA1).

Katalyseret reaktion:

phosphatidylcholin + h(2)o <>

2-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

Kommentar(er): har en meget bredere specificitet end EC 3.1.1.4.

25

Phospholipase A2 defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC 3.1.1.4.

Officielt navn: phospholipase A2 (PLA2).

Alternativt navn(e): phosphatidylcholin 2-acylhydrolase, lecithinase a, phosphatidase eller phosphatidolipase.

30

Katalyseret reaktion:

phosphatidylcholin + h(2)o <>

1-acylglycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

Kommentar(er): virker også på phosphatidylethanolamin, cholinplasmalogen og phosphatider, idet den fjerner fedtsyren, der er bundet til 2-positionen.

35

"Phospholipase B": defineres ifølge standard-enzym-EC-klassifikation som EC

3.1.1.5.

Officielt navn: lysophospholipase.

Alternativt navn(e): lecithinase b, lysolecithinase, phospholipase b eller plb.

Katalyseret reaktion:

5 2-lysophosphatidylcholin + h(2)o <> glycerophosphocholin + en fedtsyre-anion.

10 "Phospholipase-aktivitet": Udtrykket "phospholipase-aktivitet" eller "har/fremviser phospholipase-aktivitet" påtænkes som anvendt heri i forbindelse med et enzym ifølge opfindelsen at specificere et enzym, som mindst har den mængde phospholipase-aktivitet (hvad enten det er PLA eller PLB), der defineres eksperimentelt nedenfor.

15 Følgeligt defineres et enzym, der fremviser phospholipase-aktivitet, heri som et enzym, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6 heri (se nedenfor), har en phospholipase-aktivitet på mindst 0,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/min., enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C.

25 Man mere på nuværende tidspunkt, at kun et enzym med en sådan signifikant phospholipase-aktivitet har industriel interesse, for eksempel til anvendelse til degummering (US 5 264 367).

30 "En lipase med phospholipase-sideaktivitet": Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med en phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal.

35 En række lipaser har en sådan phospholipase-sideaktivitet. I forsøgseksempel 6 heri (se nedenfor) er vist nogle af lipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

"En råolie": En råolie (kaldes også en ikke-degummet olie) kan være en presset eller ekstraheret olie eller en blanding deraf fra for eksempel rapsfrø,

sojabønne eller solsikke. Phosphatid-indholdet i en råolie kan variere fra 0,5-3 % (vægt/vægt) svarende til et phosphorindhold i intervallet 200-1200 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 250-1200 ppm. Bortset fra phosphatiderne indeholder råolien også små koncentrationer af carbohydrater, sukkerforbindelser og metal/phosphatidsyre-komplekser med Ca, Mg og Fe.

"En semiråolie": En hvilken som helst olie, som ikke er en råolie, men som har et phosphatid-indhold på over 250 ppm, mere fortrinsvis på over 500 ppm. En sådan olie kunne for eksempel opnås ved at udsætte en råolie for en proces tilsvarende "vanddegummeret olie"-processen, der er beskrevet nedenfor.

"En vanddegummeret olie": En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande 1-3 % (vægt/vægt) varm vand med varm (60-90 °C) råolie. Sædvanlige behandlingstider er 30-60 minutter. Vanddegummeringstrinet fjerner phosphatiderne og slimagtige gummier, som bliver uopløselige i olien, når de hydreres. De hydrerede phosphatider og gummier kan separeres fra olien ved hjælp af fældning, filtrering eller centrifugering - idet centrifugering er den mest almindelige metode.

Det essentielle formål med nævnte vanddegummeringsproces er at separere de hydrerede phosphatider fra olien. Blandingen af varmt vand i olien, der er beskrevet ovenfor, skal heri forstås bredt som blanding af en vandig opløsning i olien ifølge kendte standard-vanddegummeringsprocedurer.

Alternativt kan processen, som her benævnes "vanddegummering af olie", kaldes "vådaffinering til fjernelse af mucilago" (se US 5 264 367).

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

En fremgangsmåde til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbare phosphatider/phospholipider

Til den foreliggende opfindelse måles mængden af ikke-hydrerbart phosphor i en spiseolie ved hjælp af:

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie =

4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

5 ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

10 iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand (til bundfældning) i 24 timer, og

15 vi) efter bundfældning udtagning af 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien.

For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20 Som illustreret i forsøgseksemplerne heri varierer phospholipidsammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) betydeligt i forskellige spiseolier. Følgelig vil niveauet af resterende phospholipid i forskellige vanddegummede olier variere over et bredt interval (for eksempel fra ca. 30 ppm til 200 ppm).

25 Til enzymatisk degummering afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbare fosfatider, som er til stede efter vanddegummering eller citronsyre/vand-forbehandling som defineret ovenfor.

30 Endvidere gælder det, at jo højere mængden af ikke-hydrerbare fosfatider, som er til stede i olien, er, jo mere effektiv er den enzymatiske degummeringsmetode.

35 Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til fjernelse af NHP-indholdet i olie, som omfatter en relativ høj mængde af NHP.

Fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 60 ppm, mere fortrinsvis mindst 100 ppm og endnu mere fortrinsvis mindst 200

ppm.

- 5 Mere fortrinsvis omfatter spiseolien et ikke-hydrerbart phosphorindhold i intervallet 60-500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 100-500 ppm og endnu mere fortrinsvis i intervallet 200-500 ppm.

- 10 En spiseolie, der ifølge beskrivelsen heri er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor kan være en vanddegummeret olie eller mere fortrinsvis en råolie eller en semiråolie.

- 15 Følgelig angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelse, hvor nævnte spiseolie er en råolie, som er kendetegnet ved at nævnte råspiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen er en olie med et phosphorindhold på over 250 ppm (part per million), idet olien ikke er blevet vanddegummeret (vanddegummering omfatter blanding af varmt vand i en varm råolie, efterfulgt af fjernelse af phosphatider, som bliver uopløselige i olien, når den hydreres) før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

- 20 En sådan råspiseolie har fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold på over 350 ppm, mere fortrinsvis over 400 ppm, endnu mere fortrinsvis over 500 ppm, og mest fortrinsvis over 600 ppm.

- 25 Nævnte råspiseolie har endvidere fortrinsvis før udførelse af nævnte fremgangsmåde ifølge opfindelsen et phosphorindhold i intervallet 250-1500 ppm, mere fortrinsvis i intervallet 350-1500 ppm, endnu mere fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm og mest fortrinsvis i intervallet 500-1500 ppm.

- 30 Den enzymatiske degummeringsmetode af en råspiseolie ifølge opfindelsen er fordelagtig i forhold til kendte metoder til enzymatisk degummering af vanddegummede spiseolier (US 5 264 367), da en direkte enzymatisk degummeringsmetode til behandling af en råolie ifølge opfindelse vil spare det første trin med vanddegummering af olien.

- 35 Dette sparer både tid og penge. En vanddegummeret olie opnås typisk ved at blande varmt vand i varm (60-90 °C) råolie i sædvanligvis 30-60 minutter. I

modsatning hertil kan den fulde proces til enzymatisk degummering af råolier ifølge opfindelsen udføres på mindre end 1 time med faktisk enzymatisk behandling i ca. 25 minutter. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

- .5 Endvidere kan en spiseolie, der er defineret til at have en relativ stor mængde af ikke-hydrerbar phosphor ifølge beskrivelsen heri, være en semiråolie.

10 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen en fremgangsmåde ifølge det første aspekt af opfindelsen, hvor nævnte spiseolie er en semirå spiseolie, som er kendetegnet ved at nævnte semirå spiseolie før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen har et phosphorindhold på over 500 ppm, og hvor nævnte olie er blevet vanddegummeret før udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

15 Nævnte halvrå spiseolie er fortrinsvis en olie, som før udførelse af nævnte fremgangsmåde har et phosphorindhold på over 600 ppm, mere fortrinsvis over 750 ppm.

20 Almindeligvis vil vanddegummering af en spiseolie reducere phosphorindholdet i olien til et niveau på under 500 ppm.

25 Følgeligt er en semiråolie som beskrevet heri for eksempel måske kun blevet delvist vanddegummeret før udførelse af en fremgangsmåde til reduktion af niveauet af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen.

30 Udtrykket "delvist vanddegummeret" angiver, at vanddegummeringsproceduren af olien kun har været en delvis/kort proces sammenlignet med en standard-vanddegummeringsprocedure.

En "delvis vanddegummerings"-proces kan udføres ved kun at blande 0,5 % varmt vand i olien (standard er 1-3 % varmt vand. Se afsnittet "Definitioner" heri) eller ved at reducere behandlingstiden til 10 minutter (standard er 30-60 minutter).

35 Alternativt kan en semiråolie som defineret heri være en blanding af en råolie og en semiråolie.

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde ifølge en hvilken som helst del af det første aspekt af opfindelsen, som omfatter følgende trin:

- 5 i) justering af temperaturen i spiseolien til en temperatur mellem 25 °C og 70 °C,
- 10 ii) forbehandling af spiseolien til ovennævnte justerede temperatur ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand, i 5-120 minutter, hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien,
- 15 iii) justering af pH i vand/olie-emulsionen til en pH mellem 1,5 og 8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning),
- 20 iv) kontaktbringning mellem vand/olie-emulsionen og en vandig opløsning af en phospholipase (ved en temperatur (± 5 °C), der er justeret ifølge trin i)), idet phospholipasen er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm,
- v) separering af vandfasen fra den behandlede olie.

25 Temperaturen i spiseolien i trin i) umiddelbart ovenfor justeres fortrinsvis til en temperatur, som er den optimale temperatur for phospholipase-aktivitet for enzymet, der anvendes i fremgangsmåden.

30 For den kommercielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ (Novo Nordisk A/S) er denne ca. 60 °C, og for en phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra trådsvampeslægten *Fusarium*, er den ca. 45 °C. Se forsøgseksempler heri for yderligere detaljer angående dette emne.

Det forudses, at hovedparten af trådsvampe-phospholipaserne vil have et temperaturoptimum omkring 35-50 °C.

35 Følgeligt angår en udførelsesform for opfindelsen fremgangsmåden, der er beskrevet umiddelbart ovenfor, hvor temperaturen i spiseolien i trin i) justeres til en temperatur mellem 35 °C og 50 °C, og phospholipasen, der anvendes i

trin iv) er opnået fra en trådsvampestamme.

5 I trin ii) i fremgangsmåden ovenfor forbehandles spiseolien ved den justerede temperatur (trin i)) ved hjælp af tilsætning af 0,5-6 % (vægt i forhold til olien) af en vandig opløsning, som omfatter mindst 85 % vand i 5-120 minutter, og hvor nævnte forbehandling ikke følges af fjernelse af hydreret mucilago og phosphorindhold i olien.

10 Dette trin er et standard-forbehandlingstrin ved enzymatisk degummering af spiseolier (US 5 264 367, US 5 558 781). Formålet med trin ii) er at hydrere de hydrerbare/hydrofile bestanddele (såsom det hydrerbare phosphorindhold) i spiseolien, som, når de hydreres, bliver uopløselige i olien.

15 Dette trin er imidlertid anderledes end, hvad man benævner "vanddegummering af en spiseolie" i den foreliggende forbindelse. Én vigtig forskel er, at nævnte forbehandlingstrin ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien. Fjernelse af nævnte hydrerede indhold fra olien er hovedformålet med vanddegummering af spiseolier.

20 Følgelig omfatter olien stadig, når phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv) ovenfor, nævnte hydrerede phosphatider og mucilago.

25 Med andre ord beskriver fremgangsmåden ovenfor, hvis spiseolien er en ikke-vanddegummet spiseolie, en simplificeret degummeringsmetode, som ikke fjerner de hydrerede phosphatider og mucilago fra olien, før nævnte olie bringes i kontakt med phospholipasen.

30 Den vandige opløsning, som omfatter mindst 85 % vand (trin ii ovenfor), omfatter fortrinsvis yderligere citronsyre. Der er fortrinsvis mellem 1-15 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning, mere fortrinsvis er der mellem 3-11 % (vægt/vægt) citronsyre i nævnte vandige opløsning.

Tidsrummet i trin ii) er fortrinsvis 15-50 minutter, og mere fortrinsvis 15-30 minutter.

35 For yderligere detaljer angående nævnte forbehandling i trin ii) ovenfor henvises til forsøgseksemplerne heri.

I trin iii) ovenfor justeres pH i vand/olie-emulsionen til pH 1,5-8 (for eksempel ved hjælp af tilsætning af en passende mængde af en NaOH-opløsning). Dette gøres for at justere pH-værdien i olien, før phospholipasen bringes i kontakt med olien i trin iv). Almindeligvis vil den faktiske optimale pH-værdi afhænge af hvilket enzym, der anvendes til at blive bragt i kontakt med olien i trin iv). For yderligere detaljer angående dette emne henvises til forsøgseksemplerne heri.

Almindeligvis foretrækkes det ifølge det første aspekt af opfindelsen og udførelsesformer for dette, at kontaktbringningen mellem nævnte olie og en vandig opløsning, som omfatter en phospholipase, udføres ved pH 1,5-6, mere fortrinsvis ved pH 3-6.

pH-værdien i vandet i olie-emulsionen måles ved at udtage 2 ml vand fra olie-emulsionen og blande dem med 2 ml vand. Efter fase-separering skal det resulterende øverste olielag pipetteres fra, og pH skal måles i vandfasen. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af følgende formel: $pH_{\text{reel}} = pH_{\text{målt}} - 0,38$. For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er mængden af en phospholipase, som er emulgeret i olien, i intervallet 0,1-15 mg enzym (tørstof)/kg olie, mere fortrinsvis 0,25-5 mg enzym (tørstof)/kg olie og endnu mere fortrinsvis 0,25-2,5 mg enzym (tørstof)/kg olie.

Almindeligvis er det fordelagtigt at optimere både mængden af anvendt phospholipase og den anvendte tid til enzymatisk degummering af en spiseolie til opnåelse af et phosphorindhold på under 11 ppm. Den faktiske optimale enzymdosis og tiden vil blandt andet afhænge af hvilken phospholipase, der anvendes. For yderligere detaljer vedrørende optimering af enzymdosis og tiden for fremgangsmåden henvises til forsøgseksemplerne heri.

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet fortrinsvis til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,5-6 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 1-6 timer, mere fortrinsvis reduceres

phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, efter at nævnte olie er bragt i kontakt med 0,25-2,5 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvor phospholipasen er i kontakt med nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

5

Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer vedrørende bestemmelsen af optimale temperaturer for individuelle phospholipaser.

10

I alle aspekter og udførelsesformer for en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen reduceres phosphorindholdet i olien fortrinsvis ti mindre end 5 ppm.

15

Phosphorindholdet i olien måles som ppm (parts per million) i oliefasen i vandet, der er til stede i olieemulsionen. Analysen af phosphorindhold udføres i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7. udg. (1987)". For yderligere detaljer henvises til forsøgseksemplerne heri.

20

En udførelsesform for opfindelsen angår en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er opnået fra en pattedyreart, især hvor phospholipasen er opnået fra pancreas i nævnte pattedyreart, og mest fortrinsvis hvor phospholipasen er opnået fra pancreas fra et svin.

25

I en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen er phospholipasen fortrinsvis opnået fra en mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gær eller en bakterie.

30

Når trådsvampen, der er nævnt ovenfor, er en art af slægten *Fusarium*, er foretrukne stammer fortrinsvis stammer, såsom en stamme af *Fusarium culmorum*, *F. heterosporum*, *F. solani* eller især en stamme af *F. oxysporum*.

35

Endvidere er foretrukne stammer, når nævnte trådsvamp ovenfor er en art af slægten *Aspergillus*, stammer, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især

Aspergillus oryzae.

Endvidere er spiseolien i en fremgangsmåde til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie ifølge opfindelsen fortrinsvis en sojabønneolie, solsikkefrøolie eller mere fortrinsvis en raspfrøolie.

Karakterisering af phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

En phospholipase ifølge opfindelsen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*, er blevet grundigt karakteriseret.

Følgeligt er et aspekt af opfindelsen fortrinsvis en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis her phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3-7, målt ved 40 °C, mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 3,5-6, målt ved 40 °C, og endnu mere fortrinsvis har phospholipase A-aktivitet i pH-intervallet 4,5-5,5, målt ved 40 °C.

Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat i et NEFA test bases assay eller i en buffer omfattende 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton-Robinson (BR). Se forsøgseksemplerne heri for yderligere detaljer.

I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 5 kDa, endnu mere fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 3 kDa og mest fortrinsvis en molekylemasse på 29 ± 2 kDa.

Molekylemassen måles ved hjælp af SDS-PAGE-elektroforese som yderligere beskrevet i "Materialer og metoder"-afsnittet (se nedenfor).

I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8, mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt

(pI) i intervallet 5-7,5 og endnu mere fortrinsvis et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 5,5-7,5.

5 Det isoelektriske punkt (pI) blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

10 I en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; mere fortrinsvis i intervallet 30-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5; og endnu mere fortrinsvis i intervallet 40-50 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5.

15 Temperaturoptimummet for phospholipase-aktivitet blev målt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved pH 5. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer (se nedenfor).

20 I endnu en yderligere udførelsesform for opfindelsen er en isoleret phospholipase A, som er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium*, fortrinsvis én, som har et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 7-11,5 ved 37 °C, mere fortrinsvis i pH-intervallet 8-11 ved 37 °C, og endnu mere fortrinsvis i pH-intervallet 8,5-11 ved 37 °C.

25 pH-optimummet for phospholipase-aktivitet blev bestemt i en buffer, som omfattede 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM Britton Robinson-buffer, ved 37 °C. Se forsøgseksempel heri for yderligere detaljer.

30 En phospholipase ifølge opfindelsen omfatter fortrinsvis mindst to ud af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst tre af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, endnu mere fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen mindst fire af de fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet, og
35 mest fortrinsvis omfatter en phospholipase ifølge opfindelsen alle fem (nummereret i) til v)) ovennævnte fysiske egenskaber for enzymet.

Som beskrevet ovenfor er en phospholipase ifølge opfindelsen blevet klonet, udtrykt rekombinant og oprenset, og de N-terminale og C-terminale sekvenser af det aktive secernerede enzym er blevet bestemt.

5

Følgeligt angår en yderligere udførelsesform for opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase A-aktivitet, idet polypeptidet er opnået fra en stamme af slægten *Fusarium* og har:

10

i) PLA-aktivitet i pH-intervallet 3-10, målt ved 40 °C,

ii) en molekylemasse på 29 ± 10 kDa, bestemt ved hjælp af SDS-PAGE,

iii) et isoelektrisk punkt (pI) i intervallet 4,5-8,

15

iv) et temperaturoptimum for phospholipase-aktivitet i intervallet 25-55 °C, målt med lecithin som substrat ved pH 5, og/eller

20

v) et pH-optimum for phospholipase-aktivitet i pH-intervallet 6-12, målt med lecithin som substrat ved 37 °C,

og yderligere omfatter en aminosyresekvens, der er valgt fra gruppen, som omfatter:

25

(a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A og/eller B-enzymkodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

30

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

35

(d) en analog til polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c), som er mindst 70 % homolog med nævnte polypeptid, og

(e) et fragment af (a), (b), (c) eller (d).

I en udførelsesform for opfindelsen er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

I en yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A2-aktivitet, og i en endnu yderligere udførelsesform er det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen en phospholipase med phospholipase B-aktivitet.

Fortrinsvis er nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen phospholipase med phospholipase A1-aktivitet.

For specifikke eksempler på standardteknikker til måling af individuel PLA1-, PLA2- og/eller PLB-aktivitet henvises til forsøgseksemplerne heri.

I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, målt som relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som måler frigørelse af frie fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor den forholdsmæssige andel af phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er mere end 0,25, mere fortrinsvis mere end 0,5 og mest fortrinsvis mere end 0,80.

For yderligere detaljer vedrørende måling af afhængigheden for enzymaktiviteten af Ca^{2+} -koncentrationen henvises til forsøgseksempler heri.

Nogle lipaser kan have begrænset phospholipase-aktivitet. I den aktuelle forbindelse defineres en sådan begrænset phospholipase-aktivitet for nævnte lipaser som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet" (se afsnittet "Definitioner" heri). Den foreliggende opfindelse angår et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet, hvor phospholipase-aktiviteten for nævnte

isolerede polypeptid er så høj, at det har industriel relevans.

5 Følgeligt angår opfindelsen et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er en phospholipase med phospholipase-aktivitet, som er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:

10 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overflade af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroformopløsning,

15 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle,

20 c. en bufferopløsning (som ovenfor) indeholdende 60 µg enzym injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveaue",

25 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, æstimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) af DDPC.

30 Se afsnittet "Definitioner" og forsøgseksempler heri for yderligere beskrivelser af foretrukne mængder af phospholipase-aktiviteter for et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen.

Endvidere kan den specifikke phospholipase-aktivitet for en phospholipase ifølge opfindelsen måles ved hjælp af kendte standardassays for phospholipase-aktivitet.

35 Følgeligt angår den foreliggende opfindelse i en yderligere udførelsesform et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor

phospholipasen er en phospholipase, som har en phospholipase-aktivitet, der er i stand til at frigøre mindst 7 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst 15 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, endnu mere fortrinsvis mindst 30 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym og mest fortrinsvis mindst 50 μmol fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

phospholipase-aktivitet måles i et assay, der måler frigørelse af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, der omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter.

For yderligere detaljer vedrørende denne udførelsesform for opfindelsen henvises til forsøgseksemplerne heri.

Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er meget egnet til udførelse af enzymatisk degummering af en spiseolie.

Følgeligt angår opfindelsen:

1. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie, ifølge en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

2. et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm), hvorved phosphorindholdet i olien reduceres til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som emulgeres i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

Det isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen er fortrinsvis i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummede spiseolie (som defineret umiddelbart ovenfor) på mindre

end 1,5 timer og anvender mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie.

5 Et isoleret polypeptid, som fremviser phospholipase-aktivitet og har egenskaberne, der er vist ovenfor, ifølge opfindelsen opnås fortrinsvis fra en trådsvampestamme fra slægten *Fusarium*.

10 Uden at være begrænset af nogen teori forventes det imidlertid på nuværende tidspunkt, at en phospholipase ifølge opfindelsen også kan opnås fra en anden mikroorganisme, fortrinsvis en anden trådsvampestamme. Eksempler derpå er givet i afsnittet "Mikrobielle kilder" (se nedenfor).

Klonet DNA-sekvens

15 På trods af en række tekniske vanskeligheder (se afsnittet "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", se nedenfor) har de foreliggende opfindere været i stand til at klonе en phospholipase, der fremviser PLA-aktivitet, fra en stamme af slægten *Fusarium*, nærmere bestemt *Fusarium oxysporum*.

20 Endvidere mener man på nuværende tidspunkt, at det er muligt at klonе både en beslægtet phospholipase A- og/eller phospholipase B-kodende DNA-sekvens på basis af sekvensinformationen, der tilvejebringes i den foreliggende ansøgning.

25 Følgeligt vedrører et aspekt af opfindelsen en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet, idet DNA-sekvensen er valgt fra gruppen, der omfatter:

30 (a) den phospholipase A-kodende del af polynukleotidet, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli* DSM 11299,

(b) DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, mere fortrinsvis positionerne 113-1063 i SEQ ID NO: 1, eller endnu mere fortrinsvis positionerne 113-929 i SEQ ID NO: 1 eller den komplementære streng dertil,

35 (c) en DNA-sekvens, som er mindst 70 % homolog med nævnte DNA-sekvenser, der er defineret i (a) eller (b),

(d) en DNA-sekvens som defineret i (a) eller (b), som koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet og er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2,

(e) en DNA-sekvens, som hybridiserer med en dobbeltstrenget DNA-probe, som omfatter DNA-sekvensen, der er vist i positionerne 23-1063 i SEQ ID NO: 1, ved lav stringens,

(f) en DNA-sekvens, der koder for et polypeptid med aminosyresekvenserne som resterne 1 til 346, 31 til 346 eller 31 til 303 i SEQ ID NO: 2, eller aminosyresekvenserne, der kodes for ved hjælp af en hvilken som helst af DNA-sekvenserne ifølge (e), og

(g) en DNA-sekvens, som er et fragment af DNA-sekvenserne, der er specificeret i (a), (b), (c), (d), (e) eller (f).

I denne specifikation påtænkes en henvisning, når en sådan gøres til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299, også at indbefatte den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1.

Følgelig kan udtrykkene "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i DSM 11299" og "den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der fremgår af SEQ ID NO: 1" bruges vilkårligt.

DNA-sekvensen kan være af genomisk, cDNA eller syntetisk oprindelse eller en hvilken som helst kombination deraf.

Den foreliggende opfindelse omfatter også en klonet DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase A- og/eller phospholipase B-aktivitet og har aminosyresekvensen, der er vist som den modne del i SEQ ID NO: 2, som adskiller sig fra SEQ ID NO: 1 som følge af degenereringen af den genetiske kode.

DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, og/eller en analog sekvens ifølge opfindelsen kan klones fra en stamme af trådsvampen *Fusarium oxysporum*, som danner enzymet med phospholipase-aktivitet, eller en anden eller
 5 beslægtet organisme som yderligere beskrevet nedenfor (se afsnittet "Mikrobielle kilder").

Alternativt kan den analoge sekvens konstrueres på basis af DNA-sekvensen, der er vist som den phospholipase-kodende del af SEQ ID NO: 1, den kan for
 10 eksempel være et udsnit deraf og/eller konstrueres ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner, som ikke giver anledning til en anden aminosyresekvens for phospholipasen, der kodes af DNA-sekvensen, men svarer til kodonanvendelsen for værtsorganismen, som påtænkes til produktion af enzymet, eller ved hjælp af indførelse af nukleotidsubstitutioner,
 15 som kan give anledning til en anden aminosyresekvens (det vil sige en variant til phospholipasen ifølge opfindelsen).

Når der udføres nukleotidsubstitutioner, er aminosyre-ændringerne fortrinsvis af en mindre betydende type, det vil sige konservative aminosyresubstitutioner, som ikke i betydelig grad påvirker proteinets foldning eller aktivitet; små
 20 deletioner, typisk af en til ca. 30 aminosyrer; små amino- eller carboxyterminale forlængelser, såsom en aminoterminal methioninrest; et lille linkerpeptid på op til ca. 20-25 rester; eller en lille forlængelse, som letter oprensningen, såsom et polyhistidin-område; en antigen epitop eller et
 25 bindingsdomæne.

Eksempler på konservative substitutioner er inden for gruppen af basiske aminosyrer, såsom arginin, lysin, histidin; sure aminosyrer, såsom glutaminsyre og asparaginsyre, polære aminosyrer, såsom glutamin og
 30 asparagin, hydrofobe aminosyrer, såsom leucin, isoleucin, valin, aromatiske aminosyrer, såsom phenylalanin, tryptofan, tyrosin, og små aminosyrer, såsom glycin, alanin, serin, threonin, methionin. For en generel beskrivelse af nukleotidsubstitution, se for eksempel Ford et al. (1991), Protein Expression and Purification 2:95-107.

35 Det vil være klart for fagfolk, at sådanne substitutioner kan foretages uden for de områder, der er kritiske for molekylets funktion, og stadig resultere i et aktivt

polypeptid. Aminosyrer, der er essentielle for aktiviteten af polypeptidet, som kodes af den klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen og derfor fortrinsvis ikke har været genstand for substitution, kan identificeres i overensstemmelse med kendte procedurer, såsom sekvensstyret mutagenese eller alanin-scanningsmutagenese (cf. for eksempel Cunningham and Wells (1989), Science 244:1081-1085). I sidstnævnte teknik indføres mutationer i hver rest i molekylet, og de resulterende mutante molekyler testes for biologisk (for eksempel phospholipase-) aktivitet til identificering af aminosyrerester, der er kritiske for molekylets aktivitet. Sites for substrat-enzym-interaktion kan også bestemmes ved hjælp af en analyse af krystalstrukturen, der bestemmes ved hjælp af teknikker, såsom nuklear magnetisk resonans-analyses, krystallografi eller fotoaffinitetsmærkning (cf. for eksempel de Vos et al. (1992), Science 255:306-312; Smith et al. (1992), J. Mol. Biol. 224:899-904; Wlodaver et al. (1992), FEBS Lett. 309:59-64).

Polypeptider ifølge den foreliggende opfindelse indbefatter også fusionerede polypeptider eller spaltbare fusionspolypeptider, hvori et andet polypeptid er fusioneret i N-terminalen eller C-terminalen af polypeptidet eller et fragment deraf. Et fusioneret polypeptid dannes ved hjælp af fusion af en nukleinsyresekvens (eller en del deraf), som koder for et andet polypeptid, til en nukleinsyresekvens (eller en del deraf) ifølge den foreliggende opfindelse. Teknikker til frembringelse af fusionerede polypeptider er kendte og indbefatter ligering af de kodende sekvenser, som koder for polypeptiderne, således at de er i læseramme, og således at ekspression af det fusionerede polypeptid er under kontrol af den samme promotor(er) og terminator.

DNA-sekvensen ifølge opfindelsen kan klones fra stammen *Escherichia coli* DSM 11299 ved anvendelse af standard-kloningsteknikker, for eksempel som beskrevet af Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor, NY.

Da den foreliggende opfindelse har løst problemet med udvikling af et egnet screeningsassay til anvendelse i en ekspressionskloningsteknik til kloning af en phospholipase ifølge opfindelse, se afsnittet med overskriften "Metode til kloning af en trådsvampe-phospholipase", kan DNA-sekvensen ifølge opfindelsen nu klones ved hjælp af en hvilken som helst generel metode, som inddrager:

- kloning i egnede vektorer af et cDNA-bibliotek fra en hvilken som helst organisme, der forventes at danne phospholipasen af interesse,
- 5 - transformation af egnede gærværtsceller med nævnte vektorer,
- dyrkning af værtscellerne under passende betingelser til ekspresion af et hvilket som helst enzym af interesse, der kodes af en klon i cDNA-biblioteket,
- 10 - screening for positive kloner ved hjælp af bestemmelse af eventuel phospholipase-aktivitet hos enzymet, der dannes af sådanne kloner, og
- isolering af det enzymkodende DNA fra sådanne kloner.

15

Alternativt kan DNA'et, der koder for en phospholipase ifølge opfindelsen, da den foreliggende opfindelse for første gang tilvejebringer en klonet DNA-sekvens, som koder for et trådsvampe-PLA-enzym, i overensstemmelse med velkendte procedurer klones traditionelt fra en egnet kilde, såsom en hvilken

20 som helst af organismerne, der er nævnt i afsnittet "Mikrobielle kilder", ved anvendelse af syntetiske oligonukleotidprober, der er fremstillet på basis af en DNA-sekvens, der er beskrevet heri. For eksempel kan en egnet oligonukleotidprobe fremstilles på basis af den phospholipase-kodende del af nukleotidsekvenserne, der er vist i SEQ ID NO: 1, eller et hvilket som helst

25 egnet udsnit deraf eller på basis af aminosyresekvensen SEQ ID NO: 2.

Da endvidere en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, er en række af de specifikke udførelsesformer, som vedrører et isoleret polypeptid med

30 phospholipase-aktivitet ifølge opfindelsen, også udførelsesformer for opfindelsen for en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som koder for et polypeptid med phospholipase-aktivitet. Følgelig vedrører referencer og foretrukne og mest foretrukne udførelsesformer for nævnte isolerede polypeptid med phospholipase-aktivitet også en klonet DNA-sekvens ifølge

35 opfindelsen.

Som følge deraf vedrører en udførelsesform for opfindelsen en klonet DNA-

sekvens ifølge opfindelsen, hvor phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A1.

5 I en yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase A2, og i en endnu yderligere udførelsesform er en klonet sekvens ifølge opfindelsen en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase B.

10 Fortrinsvis koder for nævnte klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen et polypeptid med phospholipase A1-aktivitet.

Endvidere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase, som i det væsentlige er uafhængig af Ca^{2+} -koncentrationen, der måles som:

15 - relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA og 5 mM Ca^{2+} i et phospholipase-aktivitetsassay, som måler frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37 °C, efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95 °C i 5 minutter, hvor relativ phospholipase-aktivitet ved 5 mM EDTA/5 mM Ca^{2+} er et forhold, der er større end 0,25, mere fortrinsvis et forhold, der er større end 0,5.

25 Endnu yderligere angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, der er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg, ved 25 °C, målt i et enkeltlags-phospholipase-assay som følger:

30 a. i et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau) spredes på en grundigt oprenset overfalde af en bufferopløsning (10 mM Tris, pH 8,0, 25 °C) et enkeltlag af phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin) fra en chloroform-opløsning,

35 b. efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m svarende til et gennemsnitligt molekyleareal for

DDPC på ca. $63 \text{ \AA}^2/\text{molekyle}$,

5 c. en bufferopløsning (som ovenfor), der indeholder $60 \mu\text{g}$ enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen i reaktionsafsnittet (cylinder med et areal på 1520 mm^2 og et volumen på 30400 mm^3) i "nul ordens-niveauet",

10 d. enzymatisk aktivitet bestemmes ved hjælp af hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget til opretholdelse af konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter, hvor antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut af enzymet, æstimeres ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

15 I en yderligere udførelsesform angår opfindelsen en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelse, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er en phospholipase med en phospholipase-aktivitet, som er i stand til at frigøre mindst $7 \mu\text{mol}$ fri fedtsyre/minut/mg enzym, mere fortrinsvis mindst $15 \mu\text{mol}$ fri fedtsyre/minut/mg enzym, målt som følger:

20 phospholipase-aktivitet måles i et assay, der måler frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin i en buffer, som omfatter 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5, der inkuberes i 10 minutter ved 37°C , efterfulgt af standsning af reaktionen ved 95°C i 5 minutter.

25 I yderligere udførelsesformer angår opfindelsen:

30 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en spiseolie i overensstemmelse med en fremgangsmåde ifølge opfindelsen til reduktion af mængden af phosphor-indeholdende bestanddele i en spiseolie, som omfatter et ikke-hydrerbart phosphorindhold på mindst 50 ppm, og

35 en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre enzymatisk degummering af en vanddegummeret spiseolie (med et phosphorindhold på 50-250 ppm) og derved reducere phosphorindholdet i olien til mindre end 11 ppm, hvor den enzymatiske degummeringsproces omfatter kontaktbringning mellem nævnte

olie ved en pH fra 1,5 til 8 og en vandig opløsning af phospholipasen, som er emulgeret i olien, indtil phosphorindholdet i olien er reduceret til mindre end 11 ppm, og efterfølgende separering af den vandige fase fra den behandlede olie.

- 5 En klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen er fortrinsvis en klonet DNA-sekvens, hvori phospholipasen, der kodes af nævnte DNA-sekvens, er i stand til at udføre nævnte enzymatiske degummeringsproces i den vanddegummede spiseolie ved anvendelse af mindre end 2 mg phospholipase (tørstof)/kg olie, og hvorved phospholipasen er i kontakt med
- 10 nævnte olie i et tidsrum på 15 minutter til 2 timer.

Fremgangsmåde til kloning af en trådsvampe-phospholipase

- 15 Man stødte på en række tekniske vanskelighed, da man forsøgte at isolere en phospholipase ifølge opfindelsen eller klone et polynukleotid, som kodede for den. Det syntes umuligt at isolere enzymet, og problemet med kloning af polynukleotidet blev forfulgt.

- 20 Som beskrevet heri var der ingen kendt DNA-sekvens, som kodede en trådsvampe-phospholipase A, tilgængelig. Følgelig udviklede de foreliggende opfindere en kloningsstrategi på basis af ekspressionskloning-i-gær-teknikken (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953).

- 25 Ét af de største problemer i forbindelse med denne teknik var, at gær danner en indre aktivitet, som giver anledning til en phospholipase-baggrund i udpladningsassays. Denne baggrund viste sig at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres omhyggeligt til at niveau, hvor baggrunden var lav nok, til at assayet
- 30 kunne være pålideligt under ekspressionsklonings-screeningsproceduren, men høj nok til at reaktionen kan finde sted.

- Ydermere omfatter trådsvampepestammer almindeligvis en række forskellige lipaser, hvoraf nogle endog fremviser begrænset phospholipase-aktivitet.
- 35 Sådanne lipaser defineres heri som "en lipase med phospholipase-sideaktivitet (se afsnittet "Definitioner" heri).

I udpladningsassayet viste baggrunden af sådanne lipaser med phospholipase-sideaktivitet sig også at være stærkt afhængig af mængden af substrat i assayskålene, og mængden af substrat skulle derfor titreres endnu mere omhyggeligt for at eliminere baggrundsaktiviteten fra både gærcellerne og trådsvampelipaserne med phospholipase-sideaktivitet.

Ud over dette viste det sig, at der skulle foretages et omhyggeligt valg af substrat, da mange ikke tilvejebragte nogen funktionel løsning på problemet, fordi en række af de testede phospholipase-substrater gav en baggrundsaktivitet, som skyldtes, at lipaser uden phospholipase-aktivitet var i stand til at reagere på substraterne. Følgelig skulle et stort antal substrater testes og titreres for at identificere et egnet substrat.

Den fundne løsning til muliggørelse af udførelse af ekspressionskloning af et phospholipase-kodende polynukleotid var anvendelse af Lipoid E80 (fra Lipoid GmbH) i omhyggeligt målte koncentrationer. I "Materiale og metode"-afsnittet heri findes en detaljeret beskrivelse af den komplette ekspressionskloning-i-gær-metode, herunder et udpladningsassay, som løser de ovenfor beskrevne problemer.

Homologi/lighed for DNA-sekvenser

DNA-sekvenshomologien/ligheden, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens fra den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 5,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,3, fremviser det kodende område af DNA-sekvensen en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, mere fortrinsvis mindst 97 % med den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1 (det vil sige position 23-1063 i SEQ ID NO: 1), eller mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 113-

1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

5

Hybridisering

Hybridiseringen, der henvises til ovenfor, påtænkes at omfatte en analog DNA-sekvens, som hybridiserer til en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1063, eller mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 113-1063 i SEQ ID NO: 1 (position 113 svarer til den N-terminale rest i det modne enzym), eller endnu mere fortrinsvis med en dobbeltstrenget DNA-probe, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i position 23-929 i SEQ ID NO: 1 (position 929 svarer til den C-terminale rest i det C-terminalt processerede secernerede aktive enzym) under i det mindste lave stringens-betingelser som beskrevet detaljeret nedenfor.

Egnede forsøgsbetingelser til bestemmelse af hybridisering ved lav, medium eller høj stringens mellem en nukleotidprobe og en homolog DNA- eller RNA-sekvens inddrager forudgående udblødning af filteret, der indeholder DNA-fragmenterne eller RNA'et, der skal hybridisere, i 5 x SSC (natriumchlorid/natriumcitrat, Sambrook et al., 1989) i 10 minutter og præhybridisering af filteret i en opløsning af 5 x SSC, 5 x Denhardt's opløsning (Sambrook et al., 1989), 0,5 % SDS og 100 µg/ml denatureret sonikeret laksesperma-DNA (Sambrook et al., 1989), efterfulgt af hybridisering i den samme opløsning, som indeholder 10 ng/ml af en vilkårlig primet (Feinberg, A.P., og Vogelstein, B. (1983), Anal. Biochem. 132:6-13), ³²P-dCTP-mærket (specifik aktivitet > 1 x 10⁹ cpm/µg) probe i 12 timer ved ca. 45 °C. Filteret vaskes herefter to gange i 30 minutter i 2 x SSC, 0,5 % SDS ved en temperatur på mindst 55 °C (lav stringens), mere fortrinsvis mindst 60 °C (medium stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 65 °C (medium/høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 70 °C (høj stringens), endnu mere fortrinsvis mindst 75 °C (meget høj stringens).

Molekyler, hvortil oligonukleotidproben hybridiserer under disse betingelser,

påvises ved anvendelse af en X-røntgenfilm.

Det har vist sig, at det er muligt teoretisk at forudsige om to givne DNA-sekvenser vil hybridisere under bestemte specifikke betingelser.

5

Følgelig kan forsøgsmetoden som et alternativ til den overfor beskrevne til bestemmelse af, om en analog DNA-sekvens vil hybridisere til nukleotidproben, baseres på en teoretisk beregning af den T_m (smeltetemperatur), hvorved to heterologe DNA-sekvenser med kendte sekvenser vil hybridisere under specificerede betingelser (for eksempel med hensyn til kation-koncentration og temperatur).

10

For at bestemme smeltetemperaturen for heterologe DNA-sekvenser ($T_m(\text{hetero})$) er det nødvendigt indledningsvis at bestemme smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for homologe DNA-sekvenser.

15

Smeltetemperaturen ($T_m(\text{homo})$) for to helt komplementære DNA-strenger (homodupleksdannelse) kan bestemmes ved anvendelse af følgende formel:

$T_m(\text{homo}) = 81,5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16,6(\log M) + 0,41(\% \text{ GC}) - 0,61(\% \text{ form}) - (500/L)$
("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995), hvor:

20

"M" = den molære kation-koncentration i vaskebuffer,

"% GC" = % Guanin (G) og Cytosin (C) af det totale antal baser i DNA-sekvensen.

25

"% form" = % formamid i vaskebufferen, og

"L" = længden af DNA-sekvensen.

Ved anvendelse af denne formel og de eksperimentelle vaskebetingelserne, der er angivet ovenfor, er $T_m(\text{homo})$ for homodupleksdannelsen for nukleotidproben, der svarer til DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, det vil sige nukleotiderne 23-1060:

30

$T_m(\text{homo}) = 81,5 + 16,6(\log 0,30) + 0,41(56) - 0,61(0) - (500/1038)$

$T_m(\text{homo}) = 103,5 \text{ } ^\circ\text{C}.$

35

"M": 2 x SSC svarer til en kation-koncentration på 0,3 M,

"% GC": % GC i SEQ ID NO: 1, position 23-1060 er 56 %.

"% form": Der er intet formamid i vaskebufferen.

"L": Længden af SEQ ID NO: 1, position 23-1063 er 1038 bp.

T_m bestemt ved hjælp af ovennævnte formel er T_m for en homodupleksdannelse (T_m(homo)) mellem to helt komplementære DNA-sekvenser. For at tilpasse T_m-værdien til en for to heterologe DNA-sekvenser, antager man, at en 1 % forskel i nukleotidsekvensen mellem de to heterologe sekvenser svarer til et fald på 1 °C i T_m ("Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995). T_m(hetero) for heterodupleksdannelsen findes derfor ved at trække homologi-%-forskellen mellem den analoge sekvens, det drejer sig om, og nukleotidproben, der er beskrevet ovenfor, fra T_m(homo). DNA-homologiprocenten, som skal trækkes fra, beregnes som beskrevet heri (se nedenfor).

Homologi med aminosyresekvenser

Polypeptidhomologien, der henvises til ovenfor, bestemmes som graden af lighed mellem to sekvenser, som viser en afvigelse af den første sekvens for den anden. Homologien kan passende bestemmes ved hjælp af kendte computerprogrammer, såsom GAP, der tilvejebringes i GCG-programpakken (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, august 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B., og Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology 48:443-453). Ved anvendelse af GAP med følgende indstilling til DNA-sekvenssammenligning: GAP-dannelses-afskæring på 3,0 og GAP-forlængelses-afskæring på 0,1, fremviser den modne del af et polypeptid, der kodes af en analog DNA-sekvens, en lighedsgrad på fortrinsvis mindst 70 %, mere fortrinsvis mindst 80 %, mere fortrinsvis mindst 90 %, mere fortrinsvis mindst 95 %, især mindst 97 % med den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2, det vil sige position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis med aminosyresekvensen, der er vist i position 31-303 i SEQ ID NO: 2 (position 303 er den C-terminale rest i C-terminalt processeret secerneret aktivt enzym).

Den foreliggende opfindelse er også rettet mod phospholipase-varianter med en aminosyresekvens, der adskiller sig i ikke mere end tre aminosyrer, fortrinsvis i ikke mere end to aminosyrer og mere fortrinsvis i ikke mere end en aminosyre fra den modne del af aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID

NO: 2.

Endvidere angår de ovennævnte foretrukne aminosyreligheder også en analog til en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, idet denne sekvens koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase-aktivitet, og som er mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der er vist i position 31-346 i SEQ ID NO: 2, eller mere fortrinsvis mindst 70 % homolog med polypeptidsekvensen, der omfatter positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2.

10 Immunologisk krydsreaktivitet

Antistoffer, der skal anvendes til bestemmelse af immunologisk krydsreaktivitet, kan fremstilles ved anvendelse af en oprenset phospholipase. Mere specifikt kan der dannes antiserum mod phospholipasen ifølge opfindelsen ved hjælp af immunisering af kaniner (eller andre gnavere) i overensstemmelse med proceduren, der er beskrevet af Axelsen et al. i A Manual of Quantitative Immuno-electrophoresis, Blackwell Scientific Publications, 1973, Chapter. 23, eller A. Johnstone og R. Thorpe, Immunochemistry in Practice, Blackwell Scientific Publications, 1982 (nærmere bestemt side 27-31). Oprensede immunoglobuliner kan opnås fra antiserumet, for eksempel ved hjælp af saltfældning $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, efterfulgt af dialyse og ionbytningskromatografi, for eksempel på DEAE-Sephadex. Immunokemisk karakterisering af proteiner kan udføres enten ved hjælp af Ouchterlony-dobbeltdiffusionsanalyse (O. Ouchterlony i: Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir, Ed.), Blackwell Scientific Publications, 1967, pp. 655-706), ved hjælp af kryds-immunelektroforese (N. Axelsen et al., supra, kapitel 3 og 4) eller ved hjælp af raket-immunelektroforese (N. Axelsen et al., kapitel 2).

30 Mikrobielle kilder

På prioriteringsdatoen for den foreliggende opfindelse er taksonomien, der anvendes nedenfor, i overensstemmelse med World Wide Web (WWW)-NCBI-taksonomi-browseren.

35 Et isoleret polypeptid med phospholipase-aktivitet og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen kan opnås fra en hvilken som helst

mikroorganisme, fortrinsvis en trådsvamp, en gærcele eller en bakterie.

5 Fortrinsvis kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme, hvor en foretrukken række er *Ascomycota*, hvor en foretrukken klasse er *Pyrenomycetes*, som omfatter den foretrukne familie *Nectriaceae*.

10 Mere fortrinsvis kan phospholipasen og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en stamme af slægten *Fusarium*, såsom en stamme af *F. culmorum*, *F. heterosporum* eller *F. solani*, især en stamme af *Fusarium oxysporum*.

15 Endvidere kan en phospholipase og den tilsvarende klonede DNA-sekvens ifølge opfindelsen opnås fra en trådsvampestamme fra slægten *Aspergillus*, såsom en stamme af *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* eller især *Aspergillus oryzae*.

20 Et isolat fra en stamme af *Fusarium oxysporum*, hvorfra en phospholipase ifølge opfindelsen kan opnås, er blevet deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

25 Deponeringsdato: 6. juni 1983
Deponents ref.: NNO41759
DSM-nr.: *Fusarium oxysporum* DSM-nr. 2672

30 Endvidere er ekspressionsplasmidet pYES 2.0, som omfatter den udforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, blevet transformeret ind i en stamme af *Escherichia coli*, som blev deponeret i overensstemmelse med the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure ved the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH,
35 Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Tyskland (DSM).

Deponeringsdato: 25. november 1996

Deponents ref.: NNO49279
DSM-nr.: *Escherichia coli* DSM-nr. 11299

Ekspressionsvektorer

5

Ekspressionsvektoren ifølge opfindelsen kan være en hvilken som helst ekspressionsvektor, som på bekvem vis kan udsættes for rekombinant-DNA-procedurer, og valget af vektor vil ofte afhænge af værtscellen, hvori vektoren skal indføres. Vektoren kan således være en autonomt replikerende vektor, det vil sige en vektor, der findes som en ekstrakromosomal enhed, hvis replikation er uafhængig af kromosomal replikation, for eksempel et plasmid. Alternativt kan vektoren være en, der, når den indføres i en værtcelle, integreres i værtscellegenomet og replikeres sammen med kromosomet eller kromosomerne, hvori den er integreret.

15

I ekspressionsvektoren skal DNA-sekvensen, der koder for phospholipasen, være operationelt koblet til en egnet promotor- eller terminatorsekvens. Promotoren kan være en hvilken som helst DNA-sekvens, der fremviser transkriptionel aktivitet i den valgte værtscelle, og kan stamme fra gener, der koder for proteiner, som enten er homologe eller heterologe for værtscellen. Procedurene, som anvendes til ligering af DNA-sekvenserne, der koder for phospholipasen, promotoren og terminatoren, og til insertion af disse i egnede vektorer er velkendte (cf. for eksempel Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY).

25

Eksempler på egnede promotorer til anvendelse i trådsvampeværtsceller er for eksempel ADH3-promotoren (McKnight et al., The EMBO J. 4:2093-2099 (1985)) eller tpiA-promotoren. Eksempler på andre anvendelige promotorer er de, der stammer fra genet, der koder for *Aspergillus oryzae*-TAKA-amylase, *Rhizomucor miehei*-asparagin-proteinase, *Aspergillus niger*-neutral α -amylase, *Aspergillus niger*-syrestabil α -amylase, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus awamori*-glucoamylase (gluA), *Rhizomucor miehei*-lipase, *Aspergillus oryzae*-alkalisk protease, *Aspergillus oryzae*-triosephosphat-isomerase eller *Aspergillus nidulans*-acetamidase.

35

Værtsceller

5 Den foreliggende opfindelse angår også rekombinante værtsceller, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, hvor cellerne med fordel kan anvendes i den rekombinante produktion af polypeptiderne. Udtrykket "værtscelle" omfatter et hvilket som helst afkom af en parentalcelle, som ikke er identisk med parentalcellen på grund af mutationer, der forekommer under replikation.

10 Cellen transformeres fortrinsvis med en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge opfindelsen, efterfulgt af integrering af vektoren i værtskromosomet.

15 "Transformation" betyder indførelse af en vektor, som omfatter en nukleinsyresekvens ifølge den foreliggende opfindelse i en værtscelle, således at vektoren opretholdes som en kromosomalt integreret sekvens eller som en selvreplikerende ekstrakromosomal vektor. Integrering anses almindeligvis for at være en fordel, da det er mere sandsynligt, at nukleinsyresekvensen opretholdes stabilt i cellen. Integrering af vektoren i værtskromosomet kan forekomme ved hjælp af homolog eller ikke-homolog rekombination som beskrevet ovenfor.

25 I en foretrukken udførelsesform er værtscellen en svampecelle. "Svampe" indbefatter som anvendt heri rækken *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* og *Zygomycota* (som defineret af Hawksworth et al., I: Ainsworth og Bisby's Dictionary of The Fungi, 8. udgave, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) såvel som *Oomycota* (som anført i Hawksworth et al., 1995, supra, page 171) og alle mitosporiske svampe (Hawksworth et al., 1995, supra). Repræsentative grupper af *Ascomycota* indbefatter for eksempel *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*) og de egentlige gær, der er anført ovenfor. Eksempler på *Basidiomycota* indbefatter paddehatte, rust og brand. Repræsentative grupper af *Chytridiomycota* indbefatter for eksempel *Allomyces*, *Blastocladiella*, *Coelomomyces* og 30 akvatiske svampe. Repræsentative grupper af *Oomycota* indbefatter for eksempel saprolegniomycetøse akvatiske svampe (vandskimmelsvampe), såsom *Achlya*. Eksempler på mitosporiske svampe indbefatter *Aspergillus*,

Penicillium, *Candida* og *Alternaria*. Repræsentative grupper af *Zygomycota* indbefatter for eksempel *Rhizopus* og *Mucor*.

- I en foretrukken udførelsesform er svampeværtscelle en trådsvampecelle.
- 5 "Trådsvampe" indbefatter alle trådagtige former af undergruppen *Eumycota* og *Oomycota* (som defineret af Hawksworth et al., 1995, supra). Trådsvampene er kendetegnet ved et vegetativt mycelium, der består af chitin, cellulose, glucan, chitosan, mannan og andre komplekse polysaccharider. Vegetativ vækst sker ved hyfal forlængelse, og carbonkatabolismen er obligat aerob. I
- 10 modsætning hertil sker vegetativ vækst hos gær, såsom *Saccharomyces cerevisiae*, ved hjælp af knopskydning fra en unicellulær thallus, og carbonkatabolismen kan være fermentativ. I en mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en celle fra en art af men ikke begrænset til *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*,
- 15 *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* og *Trichoderma* eller en teleomorf eller et synonym dertil. I en endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Acremonium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Fusarium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Mucor*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora*-celle. I en anden endnu mere
- 25 foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Tolypocladium*-celle. I en anden endnu mere foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Trichoderma*-celle. I en mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Aspergillus awamori*-, *Aspergillus foetidus*-, *Aspergillus japonicus*-, *Aspergillus niger*- eller *Aspergillus oryzae*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en
- 30 *Fusarium*-celle fra gruppen *Discolor* (også kendt som gruppen *Fusarium*). I en anden foretrukken udførelsesform er trådsvampeparentalcellen en *Fusarium*-stamme fra udsnittet *Elegans*, for eksempel *Fusarium oxysporum*. I en anden
- 35

mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Humicola insolens*- eller *Thermomyces lanuginosa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Rhizomucor miehei*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Myceliophthora thermophilum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Neurospora crassa*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Penicillium purpurogenum*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er trådsvampeværtscellen en *Thielavia terrestris*-celle. I en anden mest foretrukken udførelsesform er *Trichoderma*-cellen en *Trichoderma harzianum*-, *Trichoderma koningii*-, *Trichoderma longibrachiatum*-, *Trichoderma reesei*- eller *Trichoderma viride*-celle.

Svampeceller kan transformeres ved hjælp af en proces, der inddrager protoplast-dannelse, transformation af protoplasterne og regenerering af cellevæggen på en måde, der er kendt per se. Egnede procedurer til transformation af *Aspergillus*-værtsceller er beskrevet i EP 238 023 og Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81:1470-1474. En egnet fremgangsmåde til transformation af *Fusarium*-arter er beskrevet af Malardier et al., 1989, Gene 78:147-156 eller i sideløbende US serienr. 08/269 449. Gær kan transformeres ved anvendelse af procedurerne, der er beskrevet af Becker og Guarente, I: Abelson, J.N., og Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology 194:182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153:163; og Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920. Mammaliaceller kan transformeres ved hjælp af direkte optagelse ved anvendelse af calciumphosphat-fældningsmetoden ifølge Graham og Van der Eb (1978, Virology 52:546).

Fremgangsmåde til frembringelse af phospholipase

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en fremgangsmåde til frembringelse af et isoleret enzym ifølge opfindelsen, hvorved en egnet værtscelle, som er blevet transformeret med en DNA-sekvens, der koder for enzymet, dyrkes under betingelser, der åbner mulighed for dannelsen af enzymet, og det resulterende enzym indvindes fra kulturen.

Når en ekspressionsvektor, der omfatter en DNA-sekvens, som koder for enzymet, transformeres ind i en heterolog værtscelle, er det muligt at åbne mulighed for heterolog rekombinant produktion af enzymet ifølge opfindelsen.

- 5 Derved er det muligt at opnå en stærkt oprenset phospholipase-sammensætning, som er kendetegnet ved at være fri for homologe urenheder.

I den foreliggende opfindelse kan den homologe værtscelle være en stamme af *Fusarium oxysporum*.

10

Mediet, som anvendes til at dyrke de transformerede værtsceller, kan være et hvilket som helst traditionelt medium, som er egnet til dyrkning af de pågældende værtsceller. Den udtrykte phospholipase kan passende secerneret ud i dyrkningsmediet og indvindes derfra ved hjælp af velkendte procedurer, herunder separering af cellerne fra mediet ved hjælp af centrifugering eller filtrering, fældning af proteinagtige bestanddele i mediet ved hjælp af et salt, såsom ammoniumsulphat, efterfulgt af kromatografiske procedurer, såsom ionbytningskromatografi, affinitetskromatografi eller lignende.

20

Anvendelse af phospholipase

- 25 Foruden anvendelsen af en phospholipase i en ny fremgangsmåde ifølge opfindelse til enzymatisk degummering af en spiseolie, som omfatter en stor mængde af ikke-hydrerbart phosphor, er en række andre anvendelser af phospholipaser kendte.

Sådanne kendte anvendelser af phospholipaser er beskrevet nedenfor.

- 30 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i en hvilken som helst anvendelse, hvor det ønskes at hydrolysere fedtsyregruppen eller grupperne i et phospholipid eller lysophospholipid, såsom lecithin eller lysolecithin. Phospholipasen anvendes fortrinsvis ved pH 3-10 og ved 30-70 °C (især 40-60 °C). Hvis det ønskes, kan phospholipasen inaktiveres efter reaktionen ved
- 35 at udsætte den for varmebehandling, for eksempel ved pH 7, 80 °C i 1 time eller 90 °C i 10 minutter.

Som eksempel kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i fremstillingen af dej, brød og kager, for eksempel til at forbedre brødets eller kagens elasticitet. Phospholipasen kan således anvendes i en proces til frembringelse af brød, som omfatter tilsætning af phospholipasen til bestanddelene i en dej, æltning af dejen og bagning af dejen til frembringelse af brød. Dette kan udføres analogt med US 4 567 046 (Kyowa Hakko), JP-A 60-78529 (QP Corp.), JP-A 62-111629 (QP Corp.), JP-A 63-258528 (QP Corp.) eller EP 426211 (Unilever).

Phospholipasen ifølge opfindelsen kan også anvendes til at forbedre filtrerbarheden af en vandig opløsning eller opslemning af carbohydratoprindelse ved hjælp af behandling af den med phospholipasen. Dette er særligt anvendeligt til en opløsning eller opslemning, som indeholder et stivelseshydrolysat, især et hvedestivelseshydrolysat, da denne har en tendens til at være vanskelig at filtrere og at give uklare filtrater. Behandlingen kan udføres analogt med EP 219 269 (CPC International).

Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes til partiel hydrolyse af phospholipider, fortrinsvis lecithin, til opnåelse af forbedrede phospholipid-emuigeringsmidler. Denne anvendelse beskrives yderligere i produktark til Lecitase™ (Novo Nordisk A/S), som angår brugen deraf, og i Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Udgiver: VCH Weinheim (1996)).

Endvidere kan en phospholipase ifølge opfindelsen anvendes i en proces til produktion af et dyrefoder, som omfatter blanding af phospholipasen med foderstoffer og mindst ét phospholipid. Dette kan gøres analogt med EP 743 017.

Degummering af plante-/spiseolier i overensstemmelse med kendte procedurer

I overensstemmelse med kendte procedurer kan phospholipasen ifølge opfindelsen anvendes i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, som omfatter behandling af olien med phospholipasen til hydrolysering af hovedparten af phospholipiden og separering af en vandig fase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid fra olien. Denne proces

er anvendelig til oprensning af en hvilken som helst spiseolie, der indeholder phospholipid, for eksempel planteolie, såsom sojabønneolie, rapsfrøolie og solsikkeolie.

- 5 Får den enzymatiske behandling forbehandles planteolien fortrinsvis til fjernelse af slim (mucilago), for eksempel ved hjælp af vådraffinerings. Olien vil typisk indeholde 50-250 ppm phosphor som phospholipid ved starten af behandlingen med phospholipase, og processen ifølge opfindelsen kan reducere denne værdi til under 11 ppm, mere fortrinsvis under 5 ppm.
- 10 Den enzymatiske behandling udføres ved hjælp af dispersion af en vandig opløsning af en phospholipase, fortrinsvis som små dråber med en gennemsnitlig diameter på under 10 µm. Mængden af vand er fortrinsvis 0,5-5 vægt-% i forhold til olien. Et emulgeringsmiddel kan eventuelt tilsættes.
- 15 Mekanisk bevægelse kan anvendes til opretholdelse af emulsionen.
- Den enzymatiske behandling kan udføres ved et hvilket som helst pH i intervallet 1,5-8. pH kan justeres ved hjælp af tilsætning af citronsyre, en citratbuffer eller HCl.
- 20 En passende temperatur er almindeligvis 30-70 °C (især 40-60 °C). Reaktionsiden vil typisk være 0,5-12 timer (for eksempel 2-6 timer), og en passende enzymdosis vil sædvanligvis være 100-5000 IU pr. liter olie, især 200-2000 IU/l.
- 25 Den enzymatiske behandling kan udføres batchvis, for eksempel i en tank med omrøring, eller kan være fortløbende, for eksempel i en serie af omrørte reaktortanke.
- 30 Den enzymatiske behandling følges af separering af en vandfase og en oliefase. Denne separering kan udføres ved hjælp af traditionelle midler, for eksempel centrifugering.
- 35 I andre henseender kan processen udføres i overensstemmelse med kendte principper, for eksempel analogt med US 5 264 367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM 6(12):1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol. 95(8):300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); eller

EP 654 527 (Metalgesellschaft, Röhm).

Anvendelse af en phospholipase ifølge opfindelsen til bagning

5 Phospholipasen ifølge opfindelsen kan anvendes i brød-forbedrende additiver, for eksempel dejsammensætninger, dejadditiver, dejkonditioneringsmidler, færdigblandinger og tilsvarende præparater, som traditionelt tilsættes til melet og/eller dejen i løbet af processer til frembringelse af brød eller andre bagte produkter til tilvejebringelse af forbedrede egenskaber for brød eller andre
10 bagte produkter.

En udførelsesform for opfindelsen angår derfor en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning og endvidere anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen i sådanne sammensætninger og en dej eller
15 et bagt produkt, som omfatter en brødforbedrende og/eller en dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen.

I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykkene "brødforbedrende sammensætning" og "dejforbedrende sammensætning" at angive
20 sammensætninger, som foruden enzybestanddelen kan omfatte andre stoffer, som traditionelt anvendes til bagning til forbedring af dejens og/eller de bagte produkters egenskaber. Eksempler på sådanne bestanddele er anført nedenfor.

I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "forbedrede egenskaber" at angive en hvilken som helst egenskab, der kan forbedres ved hjælp af virkningen af et phospholipase-enzym ifølge opfindelsen. Især resulterer
25 anvendelsen af phospholipase i et forøget volumen og en forbedret krummestruktur og anti-"friskhedstab"-egenskaber hos det bagte produkt, såvel som en forøget styrke, stabilitet og reduceret klæbetilbøjelighed og
30 derved forbedret maskinbearbejdelse hos dejen. Effekten på dejen har vist sig at være særlig god, når der anvendes en mel af ringe kvalitet. Den forbedrede maskinbearbejdelse har særlig betydning i forbindelse med dej, der skal bearbejdes industrielt.

35 De forbedrede egenskaber vurderes ved hjælp af sammenligning med dej og/eller bagte produkter, der er fremstillet uden tilsætning af phospholipase

ifølge den foreliggende opfindelse.

- Den brød- og/eller dejforbedrende sammensætning ifølge opfindelsen kan yderligere omfatte et andet enzym. Eksempler på andre enzymer en cellulase, en hemicellulase, en pentosanase (der er anvendelig til partiel hydrolyse af pentosaner, som øger dejens udvidelsesevne), en glucoseoxidase (der er anvendelig til at gøre dejen stærkere), en lipase (der er anvendelig til modificering af lipider, der er til stede i dejen eller dejbestanddele til blødgøring af dejen), en peroxidase (der er anvendelig til forbedring af dejkonsistensen), en protease (der er anvendelse til glutensvækkelse, især ved anvendelse af hård hvedemel), en peptidase og/eller en amylase, for eksempel α -amylase (der er anvendelig til tilvejebringelse af sukre, der kan fermenteres ved hjælp af gær).
- Endvidere eller som et alternativ til andre enzybestanddele kan den dejforbedrende og/eller brødforbedrende sammensætning omfatte et traditionelt anvendt bagemiddel, for eksempel en eller flere af følgende bestanddele:
- Et mælkepulver (som tilvejebringer skorpefarve), gluten (til at forbedre svage meles gastilbageholdelsesstyrke), et emulgeringsmiddel (til at forbedre dejens udvidelsesevne og i nogen grad konsistensen af det resulterende brød), granuleret fedt (til blødgøring af dejen og for brødets konsistens), en oxidant (som tilsættes for at forstærke glutenstrukturen, for eksempel ascorbinsyre, kaliumbromat, kaliumiodat eller ammoniumpersulfat), en aminosyre (for eksempel cystein), en sukker og salt (for eksempel natriumchlorid, calciumacetat, natriumsulfat eller calciumsulfat, hvis funktion er at gøre dejen fastere), mel eller stivelse.
- Eksempler på egnede emulgeringsmidler er mono- eller diglycerider, diacetylvinsyre-estere af mono- eller diglycerider, sukker-estere af fedtsyrer, polyglycerol-estere af fedtsyrer, mælkesyre-estere af monoglycerider, eddikesyre-estere af monoglycerider, polyoxyethylenstearater, phospholipider og lecithin.
- I det foreliggende sammenhæng påtænkes udtrykket "bagt produkt" at indbefatte et hvilket som helst produkt, der er fremstillet af dej, som enten har

5 en blød eller en sprød karakter. Eksempler på bagte produkter, hvad enten de er af hvid, lys eller mørk type, som med fordel kan fremstilles ved anvendelse af den foreliggende opfindelse, er brød (især hvidt brød, fuldkorns- eller rugbrød), typisk i form af hele brød eller kuvertbrød, fransk baguette-type brød, pitabrød, tacos, kager, pandekager, kiks, knækbrød og lignende.

Dejen ifølge opfindelsen kan være af en hvilken som helst af typerne, der er beskrevet ovenfor, og kan være frisk eller frosset.

10 Fra ovennævnte beskrivelse vil det fremgå, at dejen ifølge opfindelsen normalt er en surdej eller en dej, der skal syrnies. Dejen kan syrnies på forskellige måder, såsom ved hjælp af tilsætning af natriumbicarbonat eller lignende eller ved hjælp af tilsætning af en surdej (gærende dej), men det foretrækkes at syrne dejen ved hjælp af tilsætning af en egnet gærkultur, såsom en kultur af
15 *Saccharomyces cerevisiae* (bagegær). En hvilken som helst af de kommercielt tilgængelige *S. cerevisiae*-stammer kan anvendes.

I en sidste udførelsesform angår opfindelsen anvendelsen af en phospholipase ifølge opfindelsen til fremstilling af pastadej, som fortrinsvis
20 fremstilles af durummel eller en mel af sammenlignelig kvalitet. Dejen kan fremstilles ved anvendelse af traditionelle teknikker og phospholipasen anvendes i en tilsvarende dosis, som den der er beskrevet ovenfor. Phospholipasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, for eksempel som beskrevet heri. Det påtænkes, at phospholipasen, når den anvendes til
25 fremstilling af pasta, resulterer i en forstærkning af glutenstrukturen og således en reduktion i dejens klæbetilbøjelighed og en forbedret dejstyrke.

Anvendelse af lipaseaktivitet hos et enzym ifølge opfindelsen

30 Som vist i forsøgseksemplerne heri kan en phospholipase ifølge opfindelsen yderligere fremvise lipaseaktivitet.

Følgeligt angår opfindelsen yderligere anvendelsen af denne lipaseaktivitet i standardanvendelser af en lipase, især til anvendelse i rengørings- og
35 detergentsammensætninger. Sådanne rengørings- og detergentsammensætninger er velbeskrevne, og der henvises til WO 96/34946, WO 97/07202 og WO 95/30011 for yderligere beskrivelser af

egnede rengørings- og detergentsammensætninger.

Opfindelsen beskrives mere detaljeret i følgende eksempler, som ikke på nogen måde har til hensigt at begrænse rækkevidden af den påberåbte opfindelse.

Materialer og metoder

Deponerede organismer

Fusarium oxysporum DSM 2672 omfatter phospholipasen, der koder for DNA-sekvensen ifølge opfindelsen.

Escherichia coli DSM 11299, som indeholder plasmidet, der omfatter den uforkortede cDNA-sekvens, der koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, i den bifunktionelle vektor pYES 2.0.

Andre stammer

Gærstamme: Den anvendte *Saccharomyces cerevisiae*-stamme var W3124 (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prc1::HIS3; prb1::LEU2; cir+).

E. coli-stamme: DH10B (Life Technologies).

Plasmider

Aspergillus-ekspressionsvektoren pHD414 er et derivat af plasmidet p775 (der er beskrevet i EP 238 023). Konstruktionen af pHD414 er yderligere beskrevet i WO 93/11249.

pYES 2.0 (Invitrogen).

pA2PH10 (se eksempel 7).

Generelle molekylærbiologiske fremgangsmåder

Med mindre andet er anført, blev DNA-manipuleringerne og transformationerne udført ved anvendelse af standardmetoder indenfor molekylærbiologi (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. et al. (red.), "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., og Cutting, S.M. (red.), "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990).

Enzymer til DNA-manipuleringer blev anvendt i overensstemmelse med specifikationer fra leverandørene.

Enzymer til DNA-manipuleringer

Med mindre andet er anført, er alle enzymer til DNA-manipuleringer, såsom for eksempel restriktionsendonukleaser, ligaser etc., leveret af New England Biolabs, Inc.

Phospholipase-aktivitetsassay på basis af Nefa-C-test

Substrat: L- α -lysophosphatidylcholin (Sigma).
 Substrat: Sojabønne-lecithin (Sigma nr. P3644). Anvendes til måling af phospholipase A-aktivitet.
 Nefa-C-testkit er fra Wako Chemicals Germany.
 Buffer: 20 mM NaOAc, pH 4,5.

Substratopløsning: 10 mg substrat i 1 ml milliQ-vand og 1 ml buffer (lav tilstrækkelig substratopløsning til alle prøver).

1. 15 μ l enzym tilsættes til 150 μ l substratopløsning.
2. Inkubation i 10 minutter ved 40 °C.
3. 30 μ l overføres til 300 μ l reagens 1 (fra Nefa-kit).
4. Inkubation i 10 minutter ved 37 °C.
5. Tilsætning af 600 μ l reagens 2 (fra Nefa-kit).
6. Inkubation i 10 minutter ved 37 °C.
7. Absorption for det endelige reaktionsprodukt måles ved 550 nm i overensstemmelse med Nefa-kit-instruktioner.

Den enzymaktivitet, der er nødvendig til frembringelse af 1 μ mol fedtsyre pr. minut fra enzymreaktionen, defineredes som 1 enhed.

Ekspressionskloning i gær

5

Ekspressionskloning i gær blev udført som beskrevet udførligt af H. Dalboege et al. (H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260; WO 93/11249; WO 94/14953), der medtages heri som reference.

10

Alle individuelle trin i ekstraktion af totalt RNA, cDNA-syntese, mungbønnenukleasebehandling, stump-endedannelse med T4-DNA-polymerase og konstruktion af biblioteker blev udført i overensstemmelse med referencerne, der er nævnt ovenfor.

15

Fermenteringsprocedure af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 til mRNA-isolering

20

Fusarium oxysporum DSM 2672 blev dyrket i YPD-medium i 4 dage ved 30 °C. 10 μ l supernatant blev testet for phospholipase-aktivitet i udpladningsassayet, der er beskrevet nedenfor.

mRNA blev isoleret fra mycelium fra denne kultur som beskrevet i H. Dalboege et al., Mol. Gen. Genet. (1994), 243:253-260, WO 93/11249 og WO 94/14953.

25

Identificering af positive gærkloner (udpladningsassay)

Identificering af positive gærkloner (det vil sige kloner, som omfatter et gen, der koder for phospholipase-aktivitet) blev udført som beskrevet nedenfor.

30

Gærtransformanterne udplades på SC-agar, der indeholder 2 % glucose, og inkuberes i 3 dage ved 30 °C. Et celluloseacetat-filter (OE67, Schleicher & Schuell) anbringes ovenpå cellerne og overføres herefter til skålene, der indeholder SC-agar og 2 % galactose med cellerne ovenpå filteret. Efter 3 dages inkubation ved 30 °C overføres filteret med celler til substratskåle.

35

Positive kloner identificeres som kolonier, der fremkalder en blågrøn zone i substratskålen under kolonien.

Substratskålene er fremstillet på følgende måde: 2,5 g agar (BA-30 INA Agar®, Funakoshi Co. Ltd.) tilsættes til 137,5 ml H₂O, opvarmet til kogning i en mikrobølgeovn. Efter nedkøling til ca. 60 °C tilsættes 30 ml af følgende blanding: 62,5 ml 0,4 M Tris-HCl-buffer (pH 7,5) og 50 ml 3 % Lipoid E80 (Lipoid GmbH, D-67065 Ludwigshafen, Tyskland), som er opløst i 2 % Triton X-100 (volumen/volumen), og 0,5 ml 2 % Brilliant Green-opløsning i H₂O. Koncentrationen af substratet er vigtig. Hvis koncentrationen er for høj, kan det give anledning til baggrundsaktivitet fra gærceller og/eller fra trådsvampelipaser med phospholipase-sideaktivitet.

Isolering af et cDNA-gen til ekspresion i *Aspergillus*

En phospholipase-producerende gærkoloni podes i 20 ml YPD-medium i et 50 ml-glas-reagensglas. Reagensglasset rystes i 2 dage ved 30 °C. Cellerne høstes ved hjælp af centrifugering i 10 minutter ved 3000 rpm.

DNA isoleres ifølge WO 94/14953 og opløses i 50 ml vand. DNA'et transformeres ind i *E. coli* ved hjælp af standardprocedurer. Plasmid-DNA isoleres fra *E. coli* ved anvendelse af standardprocedurer og analyseres ved hjælp af restriktionsenzymanalyse. cDNA-insertet skæres ud ved anvendelse af passende restriktionszymer og liggeres ind i en *Aspergillus*-ekspressionsvektor.

Transformation af *Aspergillus oryzae* eller *Aspergillus niger*

Protoplaster kan fremstilles som beskrevet i WO 95/02043, side 6, linie 2 - side 17, linie 12, der medtages heri som reference.

100 µl af protoplast-suspensionen blandes med 5-25 µg af det behørig DNA i 10 µl STC (1,2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, 10 mM CaCl₂). Protoplaster blandes med p3SR2 (et *A. nidulans*-amdS-gen-indeholdende plasmid). Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter. 0,2 ml 60 % PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, tilsættes og blandes omhyggeligt (to gange), og til sidst tilsættes 0,85 ml af den samme opløsning og blandes omhyggeligt. Blandingen hensættes ved stuetemperatur i 25 minutter, centrifugeres ved 2500 x g i 15 minutter, og pelleten resuspenderes i 2 ml 1,2 M sorbitol. Efter endnu en sedimentering spredes

protoplasterne i minimale skåle (Cove, Biochem. Biophys. Acta (1966), 113:51-56), som indeholder 1,0 M sucrose, pH 7,0, 10 mM acetamid som nitrogen-kilde og 20 mM CsCl til hæmning af baggrundsvækst. Efter inkubation i 4-7 dage ved 37 °C udtages sporer og spredes til enkeltkolonier. Denne procedure gentages, og sporer fra en enkeltkoloni efter den anden reisolering opbevares som en defineret transformant.

Test af *Aspergillus oryzae*- eller *Aspergillus niger*-transformanter

Hver af *Aspergillus oryzae*-transformanterne podes i 10 ml YPM (cf. nedenfor) og opformeres. Efter 2-5 dages inkubation ved 30 °C fjernes supernatanten. 20 µl supernatant påføres i huller, der er stukket i substratpladen (se ovenfor). Efter 1-24 timer viser phospholipase-aktivitet sig som en blågrøn zone omkring hullet.

Tilførsels-batchfermentering

Tilførsels-batchfermentering blev udført i et medium, som omfattede maltodextrin som carbonkilde, urinstof som nitrogenkilde og gærekstrakt. Tilførsels-batchfermenteringen blev udført ved hjælp af podning af en rystekolbekultur af *A. oryzae*-værtsceller af interesse i en medium, som omfattede 3,5 % af carbonkilden og 0,5 % af nitrogenkilden. Efter 24 timers dyrkning ved pH 7,0 og 34 °C blev den fortløbende tilførsel af yderligere carbon- og nitrogenkilder indledt. Carbonkilden blev holdt som den begrænsende faktor, og det blev sikret, at der var oxygen til stede i overskydende mængder. Tilførsels-batchdyrkningen blev fortsat i 4 dage.

Isolering af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1

Den phospholipase-kodende del af DNA-sekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 1, som koder for phospholipasen ifølge opfindelsen, kan opnås fra den deponerede organisme *Escherichia coli* DSM 11299 ved hjælp af ekstraktion af plasmid-DNA ved hjælp af kendte metoder (Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY).

Medier

YPD: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % glucose (sterilfiltreret) tilsat.

- 5 YPM: 10 g gærekstrakt, 20 g pepton, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 100 ml 20 % maltodextrin (sterilfiltreret) tilsat.

10 x basalsalt: 75 g gær-nitrogenbase, 113 g ravsyre, 68 g NaOH, H₂O til 1000 ml, sterilfiltreret.

10

SC-URA: 100 ml 10 x basalsalt, 28 ml 20 % casaminosyrer uden vitaminer, 10 ml 1 % tryptophan, H₂O til 900 ml. Autoklaveret, 3,6 ml 5 % threonin og 100 ml 20 % glucose eller 20 % galactose tilsat.

- 15 SC-agar: SC-URA, 20 g/l agar tilsat.

SC-variantagar: 20 g agar, 20 ml 10 x basalsalt, H₂O til 900 ml, autoklaveret.

PEG 4000 (polyethylenglycol, molekylvægt = 4.000) (BDH, England).

20

EKSEMPLER

EKSEMPEL 1

- 25 Fermentering af *Fusarium oxysporum*-phospholipase

En kultur af *Fusarium oxysporum* DSM 2672 på et skråstivnet agarsubstrat blev overført til fem 500 ml-rystekolber, hver med 100 ml Bouillon-3-medium, og omrystet ved 30 °C i 1 dag (200 rpm, amplitude 2,5 cm).

30

Sammensætningen af Bouillon-3-medium var som følger:

	Pepton	6 g/l
	Trypsinfordøjet kasein	4 g/l
35	Gærekstrakt	3 g/l
	Kødekstrakt	1,5 g/l
	Glucose	1 g/l

Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

5 Dyrkningsmediet fra disse Boullion-3-rystekolber blev anvendt som podekultur til podning af tyve 500 ml-rystekolber, hver med 200 ml PL-1-medium.

Sammensætningen af PL-1-mediet var som følger:

	Pepton	10 g/l
10	Tween®-80	12 g/l
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/l
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g/l
	pH før autoklavering	6,0

15 Mediet blev autoklaveret ved 121 °C i 40 minutter.

Hver PL-1-rystekolbe blev podet med 0,5-2 ml Boullion-3-dyrkningsmedium og rystet ved 200 rpm (amplitude 2,5 cm) ved 30 °C i 5 dage. Dyrkningsmediet fra rystekolberne blev puljet ved høst til opnåelse af 3,9 l med et enzymudbytte på 53 LU/ml.

20

EKSEMPEL 2

Oprensning af phospholipase

25

Trin 1) Én liter fermenteringssupernatant blev centrifugeret, og det resulterende præcipitat blev smidt ud. Supernatanten blev herefter justeret til 0,8 M ammoniumacetat ved hjælp af tilsætning af fast ammoniumacetat.

30

Trin 2) Hydrofobisk kromatografi - Toyopearl butyl 650 C-matrix blev leveret af Toso Hass (Röhm and Haas Company, Tyskland). En 50 ml-søjle blev pakket med matrixen. Søjlen blev vasket med 50 % ethanol og efterfølgende med vand. Søjlen blev herefter ækvilibreret med 0,8 M ammoniumacetat. Fermenteringssupernatanten, som var justeret med 0,8 M ammoniumacetat, blev herefter påsat søjlen. Ubundet materiale blev herefter vasket med 0,8 M ammoniumacetat, indtil alt UV-absorberende materiale (280 nm) var fjernet.

35

Søjlen blev herefter elueret med vand og efterfølgende med 50 % ethanol.

5 Phospholipase-aktivitet blev bestemt ved pH 4,5 og 40 °C ved anvendelse af Nefa-kittet som beskrevet ovenfor. Fraktioner, som indeholdt aktivitet i vand- og alkohol-eluat, blev puljet. Aktiviteten blev målt ved pH 4,5 ved anvendelse af et Nefa-kitassay.

10 Fraktioner, som indeholdt phospholipase-aktivitet, blev herefter puljet og dialyseret og opkoncentreret ved anvendelse af en Amicon-ultrafiltreringsmembran med en afskæring på 10 kDa.

Trin 3) Negativ absorption på DEAE-hurtigflowkromatografi.

15 DEAE FF blev købt ved Pharmacia, og en 50 ml søjle blev pakket med matrixen.

Søjlen blev herefter vasket som beskrevet af producenten og ækvilibreret med 25 mM Tris-acetatbuffer, pH 7.

20 Den dialyserede og opkoncentrerede prøve blev herefter justeret til pH 7 og konduktans 2 mSi og påsat en DEAE FF-anionbytningsøjle. Aktivitet blev opsamlet som effluent. Aktiviteten binder ikke til en anionbytter ved pH 7.

25 Effluenten fra DEAE FF, som indeholdt aktivitet, blev opkoncentreret og dialyseret ved anvendelse af en Amicon-membran med en afskæring på 10 kDa og en 25 mM natriumacetat-buffer, pH 6.

30 Gelfiltrering på Superdex 75.

Superdex 75-forpakket søjle Hiloal Tm 16/60 fra Pharmacia blev vasket og ækvilibreret med 25 mM natriumacetat, pH 6, som indeholdt 150 mM NaCl.

35 To ml af den opkoncentrerede effluent fra anionbytteren, som fremviste phospholipase-aktivitet ved pH 4,5 og 40 °C, blev påsat Superdex-søjlen.

Aktiviteten blev separeret fra ved hjælp af gelfiltrering med en flowhastighed

på 1 ml/minut.

EKSEMPEL 3

- 5 Karakterisering af oprenset phospholipase, som er opnået fra *Fusarium oxysporum*

10 En karakterisering som beskrevet nedenfor blev udført på en *Fusarium oxysporum*-phospholipase, der var fermenteret som beskrevet i eksempel 1 og oprenset som beskrevet i eksempel 2.

15 Molekylvægten for phospholipase-enzymet blev bestemt ved anvendelse af færdigstøbte 4 til 20 % SDS-PAGE-geler fra Novex Tm. Proteinets molekylvægt blev bestemt under reducerende betingelser som beskrevet tidligere.

For *F. oxysporum*-phospholipase viste molekylvægten sig at være 29-30 kDa under reducerende betingelser.

20 Det isoelektriske punkt blev bestemt ved anvendelse af Ampholine PAGE-plader fra Pharmacia.
For *F. oxysporum* viste pI for proteinet sig at være omkring neutralt pH, fortrinsvis i intervallet 5,8 til 6,8.

- 25 Phospholipases termostabilitet

30 Termostabiliteten for phospholipase fra *Fusarium oxysporum* blev testet ved hjælp af DSC (differentiel scanningskalorimetri). Den termale denatureringstemperatur, T_d, blev aflæst som spidsen af denatureringstoppen i termogrammer (C_p vs. T), der opnåedes efter opvarmning af enzymopløsninger ved en konstant, programmeret opvarmningshastighed.

Eksperimentelt

- 35 En DSC II fra Hart Scientific (Utah, US, 1993) blev anvendt til forsøgene.

50 mM bufrede opløsninger blev anvendes som opløsningsmiddel for enzymet

(ca. 2 mg/ml) ved enten pH 10 (50 mM glycinbuffer), pH 7 (50 mM HEPES-buffer + 10 mM EDTA) eller pH 4 (50 mM citratbuffer). Enzym blev oprenset ifølge eksempel 2 ovenfor.

- 5 750 µl enzymopløsning blev overført til 1 ml forsejlelige standard-hastelloy-ampuller fra Hart Scientific. Ampuller blev indført i kalorimeteret og nedkølet til 5 °C i 15 minutter. Der blev foretaget termal ækvilibrering før DSC-scanningen. DSC-scanningen blev udført fra 5 °C til 95 °C ved en scanningshastighed på ca. 90 K/time. Denatureringstemperaturer blev bestemt ved en nøjagtighed på
- 10 ca. ± 2 °C.

Resultater:

TABEL 1: Spids af denatureringstop som funktion af pH

15

<u>pH</u>	<u>Td(°C)</u>
4	57 °C
7	62 °C
<u>10</u>	<u>55 °C</u>

20

Det skal bemærkes, at disse forsøg blev udført i fravær af en oliematrix, som kan influere betydeligt på enzymstabilitet. DSC-resultaterne viser en maksimal stabilitet i nærheden af neutralt pH.

25

Hvis man forudsætter irreversibel termal denaturering, er en relevant arbejdstemperatur ved industriel anvendelse, såsom degummering af olier (US 5 264 367), mindst ca. 10 grader lavere end Td-temperaturerne, der er anført i tabel 1 ovenfor.

30

Aminoterminal sekvens

Aminoterminal analyse blev udført ved anvendelse af Edman-degradering med Applied Biosystem-udstyr (ABI 473A protein sequencer, Applied Biosystem, USA) som beskrevet af producenten.

35

N-terminal(e) sekvens(er):

For *Fusarium oxysporum*-phospholipasen er den N-terminale sekvens:

N-terminal A-V-G-V-T-T-T-D-F-S-N-F-K-F-Y-I

5 Den N-terminale aminosyre "A" (Ala) er position 31 i SEQ ID NO: 2. Dette viser, at det modne phospholipase-enzym ifølge opfindelsen starter i position 31 i SEQ ID NO: 2.

Følgelig er den modne sekvens fra 31-346 i SEQ ID NO: 2.

10

EKSEMPEL 4

Phospholipase A-aktivitet

15 Phospholipase A-aktiviteten blev bestemt med sojabønne-lecithin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nefa-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant phospholipase A-aktivitet ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

20

EKSEMPEL 5

Aktivitet mod L- α -lysophosphatidylcholin

25 Phospholipase-aktiviteten blev bestemt emd L- α -lysophosphatidylcholin som substrat som beskrevet ovenfor ((Nefa-testbaser-assay) ved pH 4,5 og 40 °C.

Fusarium oxysporum-phospholipasen viste signifikant aktivitet mod L- α -lysophosphatidylcholin ved betingelserne, der er beskrevet ovenfor.

30

EKSEMPEL 6

Phospholipase-aktivitet i enkeltlags-opsætning

35 Et enkeltlags-udstyr (nul ordens-niveau, KSV5000, KSV Instruments, Finland) er blevet anvendt til måling af forskellige enzymeres aktivitet mod phospholipidet DDPC (didicanoyl (C10)-phosphatidylcholin).

Forsøg

På den grundigt oprensede overflade af en bufferopløsning (10 mM TRIS, pH 8,0, 25 °C) blev et enkeltlag af DDPC spredt fra en chloroform-opløsning. Efter afspænding af enkeltlaget (fordampning af chloroform) justeres overfladetrykket til 15 mN/m, som svarer til et gennemsnitligt molekyleareal for DDPC på ca. 63 Å²/molekyle. En bufferopløsning (se ovenfor), som indeholder ca. 60 µg enzym, injiceres gennem enkeltlaget ind i underfasen af reaktionsdelen (cylinder med et areal på 1520 mm² og et volumen på 30400 mm³) i "nul ordens-niveauet". Enzymatisk aktivitet manifesterer sig ved hastigheden af en mobil spærring, som komprimerer enkeltlaget for at opretholde konstant overfladetryk, efterhånden som uopløselige substratmolekyler hydrolyseres til mere vandopløselige reaktionsprodukter. Efter at have verificeret, at den vandige opløselighed af reaktionsprodukterne (kaprinsyre og DDPC) er betydelig højere end for DDPC, æstimeres antallet af DDPC-molekyler, som hydrolyseres pr. minut ved hjælp af enzymet, ud fra det gennemsnitlige molekyleareal (MMA) for DDPC.

Resultater

TABEL 2. Enzymers aktivitet mod DDPC i en enkeltlags-opstilling

Enzym	Aktivitet ⁷ (nmol/min)
Sigma P9279 (PLA2 fra bigift, 850 U/mg)	1,9
Enzym fra <i>Fusarium oxysporum</i>	2,7
<i>Candida antarctica</i> -B bestanddels-lipase	0
<i>Candida antarctica</i> -A bestanddels-lipase	0
Rekombinant marsvinepancreas-lipase (rGPL)	0,2
Lipolase® (Novo Nordisk A/S)	< 0,1

⁷ Beregnet ud fra reduktion i enkeltlag-areal pr. tidsenhed, induceret ved hjælp af tilstedeværelse af enzym.

"Enzym fra *Fusarium oxysporum*" i tabel 2 er en phospholipase ifølge opfindelsen, der er oprenset som beskrevet i eksempel 2.

Konklusion

Der blev ingen phospholipase-aktivitet påvist for de fleste af enzymerne, bortset fra lipaser, der er opnået fra marsvinelipase, som viste mindre phospholipase-aktivitet.

Phospholipasen ifølge opfindelsen, der var opnået fra *Fusarium oxysporum*, viste overraskende høj signifikant phospholipase-aktivitet.

Følgeligt defineres i den foreliggende opfindelse udtrykket "phospholipase-aktivitet", der anvendes heri i forbindelse med en phospholipase ifølge opfindelsen, som en aktivitet, der i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist ovenfor, er mindst 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,40 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 0,75 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,0 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; mere fortrinsvis mindst 1,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg; og endnu mere fortrinsvis mindst 1,5 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg. Udtrykket "lipase med phospholipase-sideaktivitet" defineres følgeligt som en lipase med phospholipase-sideaktivitet, hvor phospholipase-sideaktiviteten i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er vist i eksempel 6, er mindre end de ovenfor nævnte tal, der specificerer phospholipase-aktivitet.

Et eksempel på en lipase med phospholipase-sideaktivitet ifølge definitionerne heri er marsvine-lipasen, der er vist i tabel 2 ovenfor. Nævnte marsvine-lipase har en phospholipase-sideaktivitet i "enkeltlags-phospholipase-assayet", der er mindre end 0,25 nmol/minut, enzymdosis: 60 µg.

EKSEMPEL 7

Kloning og ekspression af en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672

Kloning og ekspression blev udført ved anvendelse af ekspressionskloning-i-gær-teknikken som beskrevet ovenfor.

mRNA blev isoleret fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, der var dyrket som beskrevet ovenfor, herunder bevægelse for at sikre tilstrækkelig ilttilførsel.

5 Mycelia blev høstet efter 3-5 dages vækst, straks nedfrosset i væskeformig nitrogen og opbevaret ved -80 °C. Et bibliotek fra *Fusarium oxysporum* DSM 2672, som bestod af ca. 9×10^5 individuelle kloner, blev konstrueret i *E. coli* som beskrevet med en vektorbaggrund på 1 %. Plasmid-DNA fra nogle af puljerne blev transformeret ind i gær, og der opnåedes 50-100 skåle, som indeholdt 250-400 gærkolonier, fra hver pulje.

10 Phospholipase-positive kolonier blev identificeret og isoleret i substratskåle (se ovenfor). cDNA-inserts blev amplificeret direkte fra gærkolonieme og karakteriseret som beskrevet i Materialer og metoder-afsnittet ovenfor. DNA-sekvensen for cDNA'et, der koder for phospholipasen, er vist i SEQ ID NO: 1, og den tilsvarende aminosyresekvens er vist i SEQ ID NO: 2. I SEQ ID NO: 1 definerer DNA-nukleotiderne fra nr. 23 til nr. 1060 det phospholipase-kodende område. Den del af DNA-sekvensen i SEQ ID NO: 1, som koder for den modne del af phospholipasen, omfatter positionerne 113 til 1060, der svarer til aminosyrepositionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2.

cDNA'et er opnåeligt fra plasmidet i DSM 11299.

20 Totalt DNA blev isoleret fra en gærkoloni, og plasmid-DNA blev indvundet ved hjælp af transformation af *E. coli* som beskrevet ovenfor. For at udtrykke phospholipasen i *Aspergillus* blev DNA'et fordøjet med passende restriktionsenzymmer og størrelsesfraktioneret på gel, og et fragment, som svarede til phospholipasegenet, blev oprenset. Genet blev efterfølgende ligeret til pHD414 og fordøjet med passende restriktionsenzymmer til opnåelse af plasmidet pA2PH10.

Efter amplifikation af DNA'et i *E. coli* blev plasmidet transformeret ind i *Aspergillus oryzae* som beskrevet ovenfor.

30

Test af *A. oryzae*-transformanter

35 Hver af transformanterne blev testet for enzymaktivitet som beskrevet ovenfor. Nogle af transformanterne havde en phospholipase-aktivitet, som var signifikant højere end *Aspergillus oryzae*-baggrunden. Dette viser effektiv ekspression af phospholipasen i *Aspergillus oryzae*.

EKSEMPEL 8Rekombinant ekspression af en *Fusarium oxysporum*-phospholipase

- 5 En *A. oryzae*-transformant, som omfattede *Aspergillus*-ekspressionsvektoren pA2PH10 (se eksempel 7), blev tilførsels-batchfermenteret som beskrevet ovenfor. Oprensning af den rekombinant producerede *F. oxysporum*-phospholipase blev udført som beskrevet i eksempel 2.

10 EKSEMPEL 9Karakterisering af en rekombinant udtrykt og oprenset phospholipase, der er opnået fra *Fusarium oxysporum*

- 15 Karakteriseringen blev udført på en rekombinant udtrykt og efterfølgende oprenset *Fusarium oxysporum*-phospholipase (se eksempel 8).

- 20 Disse karakteriseringsresultater med hensyn til den rekombinante *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen svarer perfekt overens med karakteriseringsresultaterne, der er vist i eksempel 3, hvor det blev vist, at det rekombinant udtrykte og oprensede enzym var det samme som den ikke-rekombinant udtrykte og oprensede phospholipase, der blev karakteriseret i eksempel 3.

- 25 Generelle assays, som anvendes til at karakterisere en rekombinant produceret phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*

Phospholipase-assays

- 30 Phospholipase-aktivitet (PHLU) blev målt som frigørelsen af fri fedtsyrer fra lecithin. 50 µl 4 % L- α -phosphatidylcholin (plante-lecithin fra Avanti, USA), 45 % Triton X-100, 5 mM CaCl₂ i 50 mM HEPES, pH 7, blev tilsat, 50 µl enzymopløsning, som var fortyndet til en passende koncentration i 50 mM HEPES, pH 7. Prøverne blev inkuberet i 10 minutter ved 30 °C, og reaktionen blev
- 35 standset ved 95 °C i 5 minutter før centrifugering (5 minutter ved 7000 rpm). Fri fedtsyrer blev bestemt ved anvendelse af Nefa C-kittet fra Wako Chemicals GmbH; 25 µl reaktionsblanding blev tilsat til 250 µl reagens A og inkuberet i 10

minutter ved 37 °C. Herefter blev 500 µl reagens B tilsat, og prøven blev inkuberet igen, 10 minutter ved 37 °C. Absorptionen ved 550 nm blev målt ved anvendelse af et HP 8452A dioderække-spektrofotometer. Prøver blev analyseret mindst in duplo. Substrat- og enzymblindprøver (forvarmede enzymprøver (10 minutter ved 95 °C) + substrat) blev indbefattet. Oleinsyre blev anvendt som fedtsyrestandard. 1 PHLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til af frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut under disse betingelser.

Alternativt blev assayet kørt ved 37 °C i 20 mM citratbuffer, pH 5 (Ca^{2+} -afhængighed) eller 20 mM Britton-Robinson-buffer (pH-profil/temperaturprofil/stabilitet).

Phospholipase A1-aktivitet (PLA1) blev målt ved anvendelse af 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin (D3761 Molecular Probes) som substrat. 190 µl substrat (100 µl D3761 (2 mg/ml i ethanol) + 50 µl 1 % Triton X-100 + 1,85 ml 50 mM HEPES, 0,3 mM DTNB, 2 mM CaCl_2 , pH 7) i en 200 µl-kuvette blev tilsat 10 µl enzym, og absorptionen ved 410 nm blev målt som funktion af tiden på HP 8452A-dioderække-spektrofotometeret ved stuetemperatur. Aktivitet blev beregnet som kurvens hældning i det lineære område. PLA1 svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre (thiol)/minut ved disse betingelser.

Phospholipase A2-aktivitet (PLA2) blev målt ved 40 °C ved anvendelse af 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrendecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholin (H361 Molecular Probes). 2 ml substrat (50 µl 1 % Triton X-100 + 25 µl 0,1 % H361 i methanol + 10 ml 50 mM HEPES, pH 7) i en 2 ml-kuvette med omrøring blev tilsat 10 µl enzym, og pyren-fluorescens-emissionen blev målt ved 376 nm (excitation ved 340 nm) som funktion af tiden (1 sekund-intervaller) ved anvendelse af Perkin Elmer LS50-apparatet. I Triton X-100/phospholipid-micellerne blev koncentrationen af phospholipid justeret til at have excimerdannelse (emitterer ved 480 nm). Ved spaltning frigøres fedtsyren i 2-positionen, som indeholder pyrengruppen, til vandfasen, hvilket resulterer i en stigning i monomer-emissionen. PLA2 blev beregnet som hældningen af kurven i det lineære område ved tilsvarende betingelser.

Lipase-assays

Lipase-aktivitet (LU) blev målt ifølge Novo Nordisk publikation AF 95. Hydrolysen af tributyrin ved 30 °C og pH 7 blev efterfulgt af et pH-stat-titreringsforsøg. 1 LU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol smørsyre/minut under standardbetingelser.

5

Aktivitet på olivenolie (SLU) blev målt som følger: 12 ml 5 mM Tris-HCl, 40 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 9, blev tilsat til 2,5 ml Sigma Lipase-substrat. pH blev justeret til pH 9 eller lige under før tilsætning af 0,5 ml lipase-opløsning (fortyndet i buffer) og udførsel af et pH-stat-titreringsassay ved 30 °C ved anvendelse af Titalab, som er kommercielt tilgængeligt fra Radiometer A/S, København, Danmark. 1 SLU svarer til den mængde enzym, der er i stand til at frigøre 1 µmol fri fedtsyre/minut ved pH 9, 30 °C.

10

Karakterisering af en rekombinant fremstillet *F. oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

15

Assayene, som blev anvendt til karakterisering af enzymerne, der er nævnt nedenfor, var assayene, der er beskrevet umiddelbart ovenfor.

20

Enzymer

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700989, OD₂₈₀ 0,83 (0,69 mg/ml), renhed > 95 % (SDS-PAGE).

25

Enzymet blev rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Lecitase™ Batch L546-F06 (10368 IU/ml, ca. 20 mg/ml). Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

30

Ca²⁺'s indflydelse på phospholipase-aktiviteten hos *F. oxysporum*-lipase-phospholipase blev undersøgt. Der observeredes ingen større forskel, uanset om EDTA eller Ca²⁺ var indbefattet i assayet eller ej (se tabel 3 nedenfor), og enzymet synes således at være relativt uafhængigt af Ca²⁺.

35

TABEL 3. *F. oxysporum*-phospholipase-aktivitets (PHLU) afhængighed af EDTA og CaCl₂ - 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM citrat, pH 5 ved 37 °C

	5 mM	1 mM	1 mM	2 mM	5 mM	10 mM
	EDTA	EDTA	CaCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂	CaCl ₂

Relativ aktivitet ¹	1,05	1,10	1	0,90	0,90	0,89
--------------------------------	------	------	---	------	------	------

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved 1 mM CaCl₂, der er normaliseret til 1.

- 5 pH-profilen blev undersøgt i Britton-Robinson-buffer ved anvendelse af plantelecithin som substrat (tabel 4). Selvom enzymet viser en alkalisk pH-profil på phospholipid med et optimum ved pH 9 eller højere, er aktiviteten stadig tilstrækkelig høj til tilvejebringelse af degummering af olier ved lavt pH og anvendelse ved bagning (se nedenfor for en sammenligning af specifikke aktiviteter).

10

TABEL 4. *Fusarium oxysporum*-phospholipases pH-profil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR, 37 °C

	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9
Relativ aktivitet ¹	0,08	0,12	0,16	0,28	0,52	0,76	1,00

¹ Relativ aktivitet er i forhold til aktiviteten ved pH 9, der er normaliseret til 1.

- 5 Temperaturprofiler for phospholipasen opnåedes ved pH 5; aktiviteten begynder at falde ved temperaturer over 40 °C (tabel 5). Dette er i rimelig overensstemmelse med temperaturstabiliteten, der måles ved præinkubering af enzymet og efterfølgende måling af residual-aktivitet (tabel 6), hvor enzymet er stabilt ved temperaturer op til 45 °C ved pH 5.

10

TABEL 5. *F. oxysporum*-phospholipase's temperaturprofil, 2 % lecithin, 2 % Triton X-100, 20 mM BR

	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	0,85	1,00	0,67	0,38	0,13

Alle data er vist som relative aktivitetsdata i forhold til aktiviteten ved pH 5, 40 °C, der er normaliseret til 1.

15

TABEL 6. *Fusarium oxysporum*-phospholipases temperaturstabilitet; præinkubation 30 minutter i 20 mM BR

	5 °C	30 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C
pH 5	1,00	0,91	1,03	1,07	0,65	0,00

Alle data er vist som residualaktivitetsdata, hvor aktiviteten efter præinkubation ved 5 °C er normaliseret til 1.

20

Enzymets lave stabilitet kan være fordelagtig til registrering af et eventuelt produkt som en proceshjælp, da det aktive enzym ikke bør forventes i slutproduktet ved hverken degummering af spiseolier eller i bagte produkter.

25

Phospholipasen, der er opnået fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen, har både phospholipase- og lipase-aktivitet.

Følgelig blev enzymets aktivitet på forskellige lipase- og phospholipase-substrater undersøgt og sammenlignet med aktiviteten hos den kommercielt tilgængelige phospholipase Lecitase™ og den kommercielt tilgængelige lipase Lipolase® (Novo Nordisk A/S).

5

F. oxysporum-phospholipase/lipasen har høj aktivitet på både tributyrin og olivenolie ved pH 7 og 9 (tabel 7). Til sammenligning er den specifikke aktivitet hos Lipolase® ca. 5000 LU/mg. Imidlertid fremviser *F. oxysporum*-lipasen i modsætning til Lipolase® en meget bredere specificitet med betydelig phospholipase-aktivitet og også thioesterase-aktivitet (se enkeltlags-eksempel 6 ovenfor, som viser, at Lipolase® ikke har en målbar phospholipase-aktivitet).

10

F. oxysporum-phospholipase/lipasen ifølge opfindelsen har en specifik aktivitet på lecithin, som er betydelig højere end den hos phospholipasen Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) ved pH 7 (tabel 7).

15

Sammenlignet med Lecitase™ har *F. oxysporum*-enzymet en 100 gange højere aktivitet ved pH 7. Phospholipase:lipase-forholdet for *F. oxysporum*-enzymet er ca. 0,225 (1000 LU/mg/225 PHLU/mg) under tilsvarende betingelser (pH 7 og 30 °C).

20

TABEL 7. *F. oxysporum*-lipase/phospholipasens aktivitet - sammenligning med Lecitase™

Enzym	LU/mg	PLU ¹ /mg	PHLU/mg	SLU/mg	PLA1/mg
<i>F. oxysporum</i>	1000	73	225	3090	2,04
Lecitase™	<0,25	2,5	1,2-3,2	0,6	0

25

¹PLU blev målt i lighed med PHLU men i 20 mM citrat, pH 5 og ved 37 °C i stedet for 50 mM HEPES, pH 7 ved 30 °C.

30

F. oxysporum-lipase/phospholipasens specificitet blev undersøgt ved anvendelse af substrater, der er specifikke for phospholipase A1, ved måling af spaltningen af thioester-bindingen i 1-positionen i 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholin.

Enzymet hydrolyserer klart 1-positionen i phospholipid (tabel 7), mens Lecitase™ (svinepancreas-PLA2) som forventet ikke viste aktivitet på dette

substrat.

C-terminal aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen ifølge opfindelsen

5

Den N-terminale aminosyresekvens for det rekombinant udtrykte modne phospholipase-protein blev bestemt som beskrevet i eksempel 3, og det blev fastslået, at denne N-terminale sekvens var den samme som bestemt for det ikke-rekombinant dannede og oprensede enzym (se eksempel 3).

10

MALDI-TOF-massespektrometri blev udført ved anvendelse af et VG ToFSpec-massespektrometer (Micromass, Manchester, UK) som beskrevet i Christgau et al., Biochem. J. 319:705-712, 1996.

15

Baggrund

20

Den N-terminale aminosyresekvens for *Fusarium oxysporum*-phospholipasen, som er udledt fra DNA-sekvensen, forudser i kombination med den kendte N-terminale aminosyresekvens for den modne phospholipase et protein på 315 aminosyrerester (aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2). Den teoretiske masse for dette udledte protein er 33.256,8 Da.

25

Ved anvendelse af MALDI-TOF-massespektrometri har vi tidligere bestemt massen af den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* til at være 28,2 kDa (data ikke vist), og på SDS-PAGE viste det sig, at molekylvægten er 29-30 kDa (se ovenfor).

30

Da de N-terminale sekvenser for den native og den rekombinante *F. oxysporum*-lipase er identiske, er det sandsynligt, at masseforskellen, som ses mellem den udledte masse og den eksperimentelle masse, er forårsaget af C-terminal processering.

35

For at undersøge dette har vi isoleret det C-terminale peptid fra den rekombinante *F. oxysporum*-lipase, som er udtrykt i *A. oryzae*, og sekventeret det gennem dets C-terminal.

Strategi

5 Den gennemsnitlige masse for den native lipase/phospholipase fra *F. oxysporum* på 28,2 kDa kan anvendes til at forudsige den mest sandsynlige C-terminale rest, som viser sig at være Ser303 (SEQ ID NO: 2).

10 Denne forudsigelse er baseret på den formodning, at enzymet er ikke-glycosyleret. Det enkelte potentielle N-glycosyleringssite, som findes i sekvensen i Asn163, anvendes sandsynligvis ikke, da der findes en Pro-rest i position 164. Tilstedeværelsen af en Pro-rest i den anden rest i konsensussekvensen for N-glycosylering (Asn-Xaa-Ser/Thr) er aldrig blevet rapporteret. Endvidere tyder formen af toppen i massespektret ikke på glycosylering. Toppen er imidlertid bredere, end man sædvanligvis oplever for

15 Da enzymets N-terminal er veldefineret, er størrelsheterogeniteten mest sandsynligt forårsaget af heterogen C-terminal processing.

20 En gennemgang af SEQ ID NO: 2 (se nedenfor) viser, at den udledte C-terminal er placeret tæt på den sidste af de 8 Cys-rester i sekvensen. Indførelse af en radioaktiv tag på Cys-resterne gør peptiderne, der indeholder Cys-rester, lette at spore gennem peptidoprensning. En kombination af den radioaktive tagging med proteolytisk degradering ved anvendelse af Asp-N-proteasen, som spalter foran Asp-rester, vil resultere i et tagget C-terminalt peptid. Endvidere vil tre indre peptider blive tagget. Sekventering af alle

25 taggede peptider vil afsløre enzymets C-terminal.

5 Sekvensen er udledt fra DNA-sekvensen og starter i N-terminalen, som er
bestemt eksperimentelt for både det native og det rekombinante enzym. De 8
Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, som er udledt ved
hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.
Asn-resten, som findes i konsensussekvensen for N-glycosylering (NXS/T) er
10 vist med (◊), men benyttes efter al sandsynlighed ikke, da X er en Pro-rest.

15 Enzymet var PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

NZAS-0007637

Enzymet blev udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

Enzymet blev denatureret og disulfidbindingerne blev reduceret, før thiolgrupperne blev reageret med I-[1-¹⁴C]-CH₂CONH₂.

5

Efter den radioaktive tagging af Cys-resterne blev lipasen degraderet ved anvendelse af Asp-N-proteasen.

10

De dannede peptider blev fraktioneret ved anvendelse af modfase-HPLC. De opsamlede fraktioner blev udsat for MALDI-TOF-massespektrometri og scintillationstælling. Fraktioner, som indeholdt betydelige mængder af radioaktivitet, blev valgt til fornyet oprenset ved anvendelse af modfase-HPLC.

15

De påny oprensede fraktioner blev udsat for scintillationstælling, og fraktionerne, som indeholdt radioaktivitet, blev efterfølgende sekventeret.

20

Nedenfor er vist en oversigt over resultaterne. Dette skema kan se kaotisk ud på grund af de mange anførte sekvenser. Skemaet indeholder imidlertid al den sekvensdata, der er opnået fra de radioaktive fraktioner, og udgør derfor grundlaget for de dragede konklusioner. Det skal bemærkes, at alle Cys-rester er dækket ved sekventeringen, de fleste af dem mere end en gang. En anden ting at bemærke er, at de afvigende spaltninger, som ses, resulterer i et stort antal små radioaktivt mærkede peptider.

U U U
 NG CPT
 NNG CPTVQ
 CSN
 CSNNG CP
 CSNNG CPTV

CNSEAAA GSKI

31 AVGVITTDPS NFKFYIQHGA AAYCNSEAAA GSKITCSNNG CPTVQNGAT 80

U
 DCS
 DCS

81 IVTSFVGSKT GIGGYVATDS ARKEIVVSFR GSNIRNWLTL NLDPGQEDCS 130

U
 LVSCC

LVSGCGVHSG FQRAW

131 LVSGCGVHSG FQRAWNEISS QATAAVASAR KANPSFNVIS TGHSLGGAVA 180

181 VLAAANLRVG GTPVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQAGGE YRVTHADDPV 230

U U
 DVKVCEG
 DVKVCEGA ANLGCNCGTL
 DVKVCEGA ANLGCNCGTL

231 PRLPPLIFGY RHTTPEFWLS GGGGDKVDYT ISDVKVCEGA ANLGCNCGTL 280

U
 DACNAG GPS

GL TDACNAG GF

281 GLDIAAHLHY FQATDACNAG GPSWRRYRSA ESDVKRATMT DAELEKKLNS 330

↑

331 YVOMDKEYVK NNQARS

346

Aminosyresekvenserne, der er opnået ved hjælp af sekventering af de radioaktivt taggedede peptider, stammede fra rekombinant *F. oxysporum*-enzym. Sekvenserne er parallelopstillet med aminosyresekvensen, der er udledt fra DNA-sekvensen. De 8 Cys-rester er vist med ↓, mens den C-terminale Ser-rest, der er udledt ved hjælp af MALDI-TOF-massespektrometri af det native enzym, er vist med ↑.

Forsøgskonklusion

Ud fra sekventeringen af alle de radioaktivt taggedede peptider er det klart, at den C-terminale del af aminosyresekvensen, der kodes i DNA'et, processeres under ekspressionen af lipasen fra *F. oxysporum*. Peptidsekvenserne peger på Ser303 som den mest sandsynlige C-terminale rest i det modne enzym i overensstemmelse med resultatet fra MALDI-TOF-massespektrometri.

På basis af dataene kan det imidlertid ikke udelukkes, at der finder differentiell C-terminal processing sted, som fører til heterogene C-termini, for eksempel tyder ét peptid på, at Phe272 også kan findes som en C-terminal rest.

EKSEMPEL 10

Generel beskrivelse af assay for enzymatisk degumming af spiseolie

Udstyr til udførelse af enzymatisk degumming

Udstyret består af en 1 l-kappebeklædt stålreaktor, som er udstyret med et stållåg, en skrue (600 rpm), skærme, en temperaturføler, et indløbsrør i toppen, en tilbageløbskøler (4 °C) i toppen og et udløbsrør i bunden. Reaktorkappen er forbundet med et termostatbad. Udløbsrøret er ved hjælp af silikoneslanger forbundet til et Silverson-i linie-blandehoved, der er udstyret med en "firkantet hul- høj shearing-skærm", som styres af en Silverson L4RT-høj shearing-lab-blander (8500 rpm, flow ca. 1,1 l/minut). Blandehovedet er udstyret med en køleslange (5-10 °C) og et udløbsrør, der via silikoneslanger er forbundet med reaktorens indløbsrør. En temperaturføler er indsat i silikoneslangen umiddelbart efter blandehovedet. Den eneste forbindelse fra reaktor/blandehoved-systemet til atmosfæren er gennem tilbageløbskøleren.

Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering

Alt køle- og termostatudstyr tændes. Herefter indføres 0,6 l (ca. 560 g) olie i reaktoren, som holdes på ca. den temperatur, der er nødvendig for det specifikke forsøg. Lab-blanderen tændes, hvorved olien starter med at cirkulere fra reaktoren til blande-hovedet og tilbage til reaktoren. Systemet får mulighed for at ækvilibrere i ca. 10 minutter, i løbet af hvilket tidsrum temperaturen finindstilles. Forbehandlingsperioden starter med tilsætning af 0,6 g (2,86 mmol) citronsyremonohydrat i 27 g MilliQ-vand (tilsat vand vs. olie = 4,8 % (vægt/vægt; [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM), hvilket sætter $t = 0$. Til $t = 30$ minutter tilsættes en passende mængde af en 4 M NaOH-opløsning.

0,0 ækviv. 4 M NaOH	-> pH 3,7
1,0 ækviv. 4 M NaOH (0,71 ml)	-> pH 4,5
1,5 ækviv. 4 M NaOH (1,07 ml)	-> pH 5,0
2,0 ækviv. 4 M NaOH (1,43 ml)	-> pH 5,5
2,5 ækviv. 4 M NaOH (1,79 ml)	-> pH 6,2
3,0 ækviv. 4 M NaOH (2,14 ml)	-> pH 8,0

Til $t = 35$ minutter udtages prøver til P-analyse og pH-bestemmelse. Umiddelbart herefter tilsættes den nødvendige mængde af enzym-opløsning (slut på forbehandlingsperiode). Prøver til P-analyse og pH-stemmelse udtages til $t = 1, 2, 3, 5, 6$ timer, og herefter standses reaktionen.

Reaktor/blande-systemet tømmes og vaskes med 2 x 500 ml 10 % Deconex/DI-vandopløsning efterfulgt af minimum 3 x 500 ml DI-vand. Tabel 8 viser en oversigt over de forskellige tilsætninger og prøvetagninger under reaktionen.

TABEL 8. Plan for enzymatisk degummering

Tid	Tilsætning af	Prøvetagning	
		P-analyse	pH-bestemmelse
		X	
0	Citronsyre		
5 min.			X
30 min.		X	X
30 + 5 min.	NaOH		
35 min.		X	X
35 + 5 min.	Enzym		
1 time		X	X
2 timer		X	X
3,5 timer		X	X
5 timer		X	X
6 timer		X	X

Phosphor-analyse

5 Prøvetagning til P-analyse:

10 Anbring 10 ml vand-i-olie-emulsion i et glascentrifugerør. Opvarm emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter. Centrifuger ved 5000 rpm i 10 minutter. Overfør ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et 12 ml-polystyrenrør og lad det stå (til bundfældning) i 12-24 timer. Efter bundfældning udtag ca. 1-2 g fra den øverste klare fase til P-analyse.

15 P-analyse blev udført i overensstemmelse med procedure 2.421 i "Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats, and Derivatives, 7th ed. (1987)":

Afvej 100 mg MgO (leicht, Merck nr. 5862) i en porcelænskål og opvarm med

- 5 en gasbrænder. Tilsæt 1-2 g olie og antænd med en gasbrænder til opnåelse af en sort, hård masse. Opvarm i en Vecstar-ovn ved 850 °C i 2 timer til opnåelse af hvid aske. Opløs asken i 5 ml 6 M HNO₃ og tilsæt 20 ml reagensblanding. Hensæt i 20 minutter. Mål absorbans ved 460 nm (anvend en blank (5 ml HNO₃ + 20 ml reagensblanding) til nuljustering). Beregn ved anvendelse af kalibreringskurve.

pH-bestemmelse

- 10 Udtag 2 ml vand-i-olie-emulsion og bland med 2 ml MilliQ-vand. Efter fase separering afpipetter det øverste olielag. Mål pH i vandfase med pH-elektrode Orion. Målinger omregnes til "reelle" pH-værdier ved hjælp af formlen:

15
$$pH_{\text{reel}} = pH_{\text{målt}} - 0,38.$$

- 20 En kalibreringskurve opnåedes ved hjælp af opløsning af 0,6 g citronsyremonohydrat i 27 g DI-vand, pH i denne opløsning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{reel}). 100 µl blev blandet med 2 ml MilliQ-vand, og pH i denne opløsning blev målt ved hjælp af pH-elektrode Orion (pH_{målt}). pH i citronsyre-opløsningen blev ændret gradvist ved hjælp af tilsætning af NaOH-opløsning, og for hver justering blev fortynding og pH-målinger udført som beskrevet ovenfor.

25 EKSEMPEL 11

Optimale degummeringsbetingelser for Lecitase™

- 30 Alle forsøg vedrørende degummering af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

- Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.
Batch C00730/B01200, 9 kg, P-indhold 186 ppm (0,47 % phosphatid).
35 Olien er ikke et kommercielt tilgængeligt produkt, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

Enzym:

Lecitase™ 10L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

- 5 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med Lecitase™ er vist i tabel 9. Standardbetingelser er: enzymdosis 535 U/kg olie (1,1 mg/kg olie), 60 °C, 2,0 ækviv. NaOH (pH 5,5). Enzymdosen er varieret fra 268-1070 U/kg olie, temperaturen er varieret fra 40-70 °C, og NaOH-tilsætning er varieret fra 1,0-3,0 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i
- 10 tabel 9.

TABEL 9. Specifikke betingelser for Lecitase™-optimering

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (U/kg olie)
10	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	0 (blind)
21	Colzro 1208	60 °C	0,0	3,7	0 (blind)
8	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
9	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	535
11	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	268
12	Colzro 1200	60 °C	2,0	5,5	1070
15	Colzro 1200	70 °C	2,0	5,5	535
17	Colzro 1200	50 °C	2,0	5,5	535
18	Colzro 1200	40 °C	2,0	5,5	535
19	Colzro 1200	60 °C	1,0	4,5	535
40	Colzro 1209	60 °C	1,5	5,0	535
44	Colzro 1429	60 °C	2,5	7,0	535
20	Colzro 1200	60 °C	3,0	8,0	535

* pH fra t = 35 minutter - 6 timer. Indenfor dette tidsrum var alle pH-bestemmelser inden for et smalt interval. Dette illustreres yderligere i eksempel 13 nedenfor.

En oversigt over de separate optimeringsundersøgelser er vist i tabel 10.

Resultaterne i tabel 10 viser:

- 5 i) at det af dosis/reaktions-undersøgelsen fremgår, at optimal enzymdosis (ved 60 °C og 2,0 ækviv. NaOH) er ca. 535 U/kg olie. Halv dosis øger degummeringstiden fra ca. 3,5 timer til 6 timer, og dobbelt dosis frembringer ingen ændring i degummeringsydeevnen. Enzymblindprøve-resultaterne er indsat til sammenligning,
- 10 ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) med dårlig ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5) og 3,0 ækviv. (pH ca. 8),
- 15 iii) at optimal temperatur er ca. 60 °C, da 70 °C ikke bringer P-niveauet helt ned, 50 °C øger degummeringstiden fra ca. 3,5 til 6 timer, og 40 °C giver dårlig ydeevne.

TABEL 10: Resultater vedrørende optimering af Lecitase™-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
10	160	140	116	118	108	109	105	109
21	178	149	-	143	142	143	147	154
8	164	139	117	85	30	-	2	3
9	164	136	109	79	14	4	3	4
11	183	149	123	104	78	35	10	7
12	165	131	117	71	13	3	4	3
15	170	139	127	83	23	10	11	9
17	162	134	127	95	56	15	11	5
18	176	151	136	100	66	28	24	28
19	171	139	147	142	142	118	91	80
40	184	149	157	126	109	73	40	30
44	226	202	197	148	99	66	40	34
20	165	136	111	102	90	81	73	72

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase ved angivne tidspunkter i timer.

5

EKSEMPEL 12

Optimale degummeringsbetingelser for en *Fusarium oxysporum*-phospholipase ifølge opfindelsen

10

Alle forsøg med enzymatisk degummering af spiseolie blev udført som beskrevet i eksempel 10.

Olie:

Vanddegummeret rapsfrøolie (Colzro) fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00730/B01208, P-indhold ca. 200 ppm

Batch C00730/B01209, P-indhold ca. 200 ppm

5 Batch C00730/B01429, P-indhold 227 ppm

Batch C00730/B01430, P-indhold 252 ppm

Olierne er ikke kommercielt tilgængelige, men er taget direkte fra produktionslinien på møllen.

10 Enzym:

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.

15 Enzymet var udtrykt rekombinant og oprenset som beskrevet ovenfor.

20 De specifikke betingelser for en serie af parameter-optimeringsforsøg med PL fra *Fusarium oxysporum* er vist i tabel 11. Standardbetingelser er: enzymdosis 1,6 mg/kg olie, 40 °C, 1,5 ækviv. NaOH (pH ca. 5,0). Enzymdosis er varieret fra 0,2-1,6 mg/kg olie, temperaturen er varieret fra 30-50 °C, og NaOH-tilsætningen er varieret fra 1,0-2,5 ækviv. svarende til de forskellige pH-niveauer som vist i tabel 11.

TABEL 11. Specifikke betingelser til optimering af PL fra *Fusarium oxysporum*

For-søg	Rapsfrøolie	Temp. (°C)	Ækv. NaOH	pH-niveau	Enzymdosis (mg/kg olie)
31	Colzro 1208	40 °C	1,5	5,0	1,6
53	Colzro 1429	40 °C	1,5	5,3	1,6
33	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,8
35	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,4
36	Colzro 1209	40 °C	1,5	5,0	0,2
38	Colzro 1209	50 °C	1,5	5,0	1,6
64	Colzro 1430	45 °C	1,5	5,0	1,6
39	Colzro 1209	30 °C	1,5	5,0	1,6
32	Colzro 1209	40 °C	1,0	3,5	1,6
13	Colzro 1200	40 °C	1,0	4,5	1,6
45	Colzro 1429	40 °C	1,25	5,0	1,6
46	Colzro 1429	40 °C	1,75	5,5	1,6
34	Colzro 1209	40 °C	2,0	5,5	1,6
37	Colzro 1209	40 °C	2,5	6,2	1,6

Forsøgsresultaterne er vist i tabel 12 nedenfor. pH-afgivelseme i tidsvinduet 35 minutter - 6 timer faldt alle inden for de forventede intervaller med kun mindre uregelmæssigheder.

5

Sammenfattet viser resultaterne i tabel 12 nedenfor:

- i) at det af dosis/reaktions-testene fremgår, at den optimale enzymdosis (ved 40 °C og 1,5 ækviv. NaOH) er ca. 0,8 mg/kg olie,
- ii) at optimal NaOH-tilsætning er ca. 1,5 ækviv. (pH ca. 5,0) med ingen ydeevne ved 1,0 ækviv. (pH ca. 4,5), med begrænset ydeevne ved 2,0 ækviv. (pH ca. 5,5) og 2,5 ækviv. (pH ca. 6,2), og

10

iii) at den optimale temperatur er ca. 45 °C, og 50 °C giver begrænset ydeevne.

5 TABEL 12: Resultater vedrørende optimering af *Fusarium oxysporum*-degummeringsbetingelser

For-søg	Tid ¹ 0	Tid ¹ 0,50	Tid ¹ 0,58	Tid ¹ 1,0	Tid ¹ 2,0	Tid ¹ 3,5	Tid ¹ 5,0	Tid ¹ 6,0
31	169	130	136	15	8	7	8	7
53	232	203	208	32	10	7	7	4
33	188	156	160	27	7	6	6	8
35	181	153	153	78	5	5	4	6
36	187	162	157	117	61	32	20	15
38	187	149	146	84	83	68	58	55
64	252	192	201	10	4	4	4	4
39	184	163	158	36	7	7	9	9
32	167	137	165	152	146	151	148	146
13	170	140	141	140	133	126	130	131
45	221	189	195	161	118	99	92	95
46	225	187	163	93	4	7	6	15
34	189	174	165	61	27	25	26	19
37	205	168	157	88	22	23	20	21

¹Phosphorindhold (ppm) i oliefase på angivne tidspunkter i timer.

EKSEMPEL 13Visning af standard-pH-afvigelser under en enzymatisk degummeringsproces

- 5 Tabel 13 nedenfor viser et gennemsnitseksempel for pH-afvigelser under den enzymatiske degummeringsproces, der udføres som beskrevet i eksempel 10.

Forsøgene udføres med Lecitase™. Se eksempel 11 for yderligere detaljer.

10 TABEL 13: pH-værdier fra t = 35 minutter - 6 timer

Tid (timer)	pH Forsøg 8 (2,0 ækv)	pH Forsøg 15 (2,0 ækv)	pH Forsøg 19 (1,0 ækv)	pH Forsøg 20 (3,0 ækv)
0,58	4,97	5,80	4,45	7,38
1,0	5,82	5,75	4,46	7,63
2,0	5,50	5,44	4,57	8,13
3,5	5,35	5,34	-	8,37
5,0	5,25	5,47	4,47	8,21
6,0	5,01	5,26	4,43	8,05

Hvis ikke andet er angivet i eksemplerne på forsøg med enzymatisk degummering, der er beskrevet heri, var standard-pH-afvigelserne i nævnte forsøg som vist i tabel 13 ovenfor.

15

EKSEMPEL 14Sammenligning af enzymatisk degummeringskapacitet hos Lecitase™ og en phospholipase fra *Fusarium oxysporum* ifølge opfindelsen

20

I figur 2 er vist resultaterne fra PL'erne under deres respektive optimale betingelser, som bestemt i eksempel 11 og 12 ovenfor.

Forsøgsbetingelser, der er vist i figur 2:

25

Lecitase™: 60 °C, pH 5,5 (2,0 ækviv. NaOH) og 1 mg enzym/kg olie (ca. 535 U) (forsøg nr. 9).

5 *Fusarium oxysporum* PL: 40 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 0,8 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 33).

Fusarium oxysporum PL: 45 °C, pH 5,0 (1,5 ækviv. NaOH) og 1,6 mg enzym/kg olie (forsøg nr. 64).

10 Tilsyneladende giver PL fra *Fusarium oxysporum* en meget hurtig degummeringseffekt sammenlignet med Lecitase™.

PL fra *Fusarium* ifølge opfindelsen giver en næsten total degummering efter ca. 25 minutters kontakt mellem enzym og olie.

15

EKSEMPEL 15

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i forskellige typer af spiseolier

20

Olier:

Rårapfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.

Denne batch indeholder faste rester.

25

Rårapfrøolie fra Scanola (Danmark).

Batch C00745/B01593, P-indhold 315 ppm.

Filtreret rårapfrøolie.

30

Batch C00745/B01146 filtreret, P-indhold 231 ppm.

Denne olie er Batch C00745/B01146 ovenfor (609 ppm), der er filtreret gennem et 100 µm Johnson-filter.

Rårapfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

35

Batch C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Rapsfrøolie fra Lurgi, Tyskland.

Batch C00932/B1381, P-indhold 148 ppm.

Råsojabønneolie fra Aarhus Oliefabrik, Danmark.

Batch C00744/B01145, P-indhold 593 ppm.

5

Bestemmelse af mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor, blev udført ved hjælp af forbehandling af olierne ved hjælp af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

I korte træk omfatter forbehandlingsprocessen,

15

i) forbehandling af spiseolien ved 60 °C ved hjælp af tilsætning af en opløsning, som omfatter citronsyremonohydrat i vand (tilsat vand versus olie = 4,8 % vægt/vægt, [citronsyre] i vandfase = 106 mM, i vand/olie-emulsion = 4,6 mM) i 30 minutter,

20

ii) overførsel af 10 ml af den forbehandlede vand-i-olie-emulsion til et reagensglas,

iii) opvarmning af emulsionen i et kogende vandbad i 30 minutter,

iv) centrifugering ved 5000 rpm i 10 minutter,

25

v) overførsel af ca. 8 ml af den øverste (olie) fase til et nyt reagensglas og henstand til bundfældning i 24 timer,

30

efter bundfældning udtag 2 g fra den øverste klare fase til måling af det ikke-hydrerbare phosphorindhold (ppm) i spiseolien. ppm-værdien blev bestemt som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Ifølge denne proces var mængden af ikke-hydrerbare phospholipider, som var til stede i de forskellige typer af spiseolier, der er vist ovenfor:

35

rårapfrøolien nr. 1146 fra AOM, der indeholder fast partikelholdigt materiale, som til dels er ansvarligt for det høje P-niveau (609 ppm), filtrering gennem et 100 µm Johnson-filter gav en klar olie med et P-indhold på 231 ppm.

Forbehandling af råolien og af den filtrerede olie gav et P-niveau på 140 ppm, som er et mål for de ikke-hydrerbare phospholipider, som er til stede i olien;

5 phospholipid-indholdet i en råapsfrøolie fra Scanola blev reduceret fra 315 ppm til ca. 30 ppm ved hjælp af forbehandling,

10 phospholipid-indholdet i en rapsfrøolie, som var opnået fra Lurgi (sandsynligvis vilkårlig blanding af råolie og totalt raffineret olie), blev reduceret til 60 ppm ved hjælp af forbehandlingsprocessen,

forbehandling råapsfrøolie nr. 1710 fra AOM reducerede P-indholdet fra 459 til 200-250 ppm,

15 ved råsojabønneolie nr. 1145 fra AOM reducerede forbehandling P-niveauet fra 593 til 10 ppm. Denne sojabønneolie er et eksempel på en olie, der kan degummes ved hjælp af vanddegumming/citrat-behandling alene. Enzymtilsætning til denne råsojabønneolie efter forbehandling reducerede ikke P-indholdet yderligere.

20 Disse data viser, at phospholipid-sammensætningen (hydrerbart vs. ikke-hydrerbart phospholipid) i råapsfrøolie varierer meget fra én batch til en anden, og følgelig vil niveauet af resterende phospholipid i vanddegummet rapsfrøolie variere over et bredt interval (30 ppm (Scanola) til 200-250 ppm (AOM)).

25 Til enzymatisk degumming afhænger den optimale enzymdosis af mængden af ikke-hydrerbart phospholipid, som er til stede efter degumming eller forbehandling.

30 Endvidere gælder det, at jo højere mængde af ikke-hydrerbart phospholipid, der er til stede i olien, jo mere anvendelig er den enzymatiske degummeringsmetode.

35 Dette illustreres også i eksempel 16 nedenfor, hvor den foreliggende opfindelse viser enzymatisk degumming af råapsfrøolie nr. 1146, som har et ikke-hydrerbart phospholipid-niveau på ca. 140 ppm.

EKSEMPEL 16Degummering af rårapsfrø-spiseolie (I)

- 5 Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

- 10 Rårapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00745/B01146, P-indhold 609 ppm.
Denne batch indeholder faste rester.

Enzym:

- 15 Lecitase™ 10 L.
Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

- 20 Batch F-9700123, OD₂₈₀ = 1,48, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,9 mg/ml.
Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A (reference)

- 25 0,6 l (580 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes 30 µl (300 U) Lecitase™ 10L (som er leveret af Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i tabel 14.

30

TABEL 14. Resultater fra degummering af rårapsfrøolie med Lecitase™

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,8
0,58	146	5,6
1,0	127	5,6
2,0	88	5,7
3,5	61	5,7
5,0	44	5,6
6,0	34	5,8

Forsøg B

- 5 0,6 l (581 g) rårapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,4. Til t = 35 minutter tilsættes 1 ml (0,9 mg) af en oprenset opløsning (eksempel 2) af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering såvel som pH-værdierne i vandfasen er vist i
- 10 tabel 15.

TABEL 15. Resultater fra degummering af rårapssfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	Phosphorindhold i oliefase	pH
0	609	
0,50	155	4,9
0,58	149	5,4
1,0	91	5,3
2,0	13	5,4
3,5	11	5,3
5,0	13	5,4
6,0	10	5,2

EKSEMPEL 17

5

Degummering af rårapssfrø-spiseolie (II)

Forsøg A og B blev udført ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

10

Olie:

Rårapssfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.

Batch C00745/B01710, P-indhold 459 ppm.

15

Enzym:

Lecitase™ 10 L.

Batch L646-F02 (10190 U/ml), æstimeret koncentration 20 mg/ml.

20

PL fra *Fusarium oxysporum* med aminosyresekvensen, der er vist i SEQ ID NO: 2.

Batch F-9700470, OD₂₈₀ = 0,8, renhed ca. 58 %, æstimeret koncentration 0,45 mg/ml.

Enzymet var rekombinant udtrykt og oprenset som beskrevet ovenfor.

Forsøg A

- 5 0,6 l (580 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 60 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,6. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (for eksempel 50 µl (ca. 500 U) til 1 mg enzym/kg olie) af Lecitase 10L (som er opnået fra Novo Nordisk A/S). Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 16.

10 TABEL 16. Resultater fra degummering af råapsfrøolie med Lecitase

Tid (timer)	1 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	2 mg Lecitase /kg olie P(ppm)	3 mg Lecitase /kg olie P(ppm)
0	459	459	459
0,50	251	235	248
0,58	202	194	202
1,0	181	186	183
2,0	165	156	107
3,5	111	66	11
5,0	52	12	12
6,0	20	5	9

Forsøg B

- 15 0,6 l (581 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,07 ml (4,3 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,0. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1,6 mg enzym/kg olie og 3,2 mg enzym/kg olie) af en oprenset opløsning af phospholipase fra *F. oxysporum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 17.

20

TABEL 17. Resultater fra degummering af råapsfrøolie med phospholipase fra *F. oxysporum*

Tid (timer)	1,6 mg <i>Fusarium</i> /l kg olie, P(ppm)	3,2 mg <i>Fusarium</i> /l kg olie, P(ppm)
0	459	459
0,50	236	208
0,58	193	173
1,0	109	96
2,0	9	7
3,5	9	8
5,0	9	9
6,0	9	9

Sammenfattet viser resultaterne:

5

Lecitase, 60 °C, pH 5,5

Enzymdosen blev varieret fra 1,0 til 3,0 mg/kg olie. Resultaterne er vist i tabel 16 ovenfor. Ved en enzymdosis på 1,0 mg/kg olie var degummering langsom og gav ca. 20 ppm efter 6 timer. Med de høje enzymdoser blev degummerings-ydeevnen forbedret til opnåelse af et phosphorindhold på 10 ppm efter ca. 3,5 timer med 3,0 mg enzym/kg olie.

10

Det formodes, at ydeevnen vil forbedres yderligere, hvis der anvendes højere enzymdoser.

15

F. oxysporum PL, 45 °C, pH 5,0

Enzymdoseerne 1,6 og 3,2 mg/kg olie blev testet, og ydeevnen viste sig at være lige god (tabel 17 ovenfor). Med 1,6 mg enzym/kg olie - eller muligvis mindre - observeredes fortræffelig degummering, som gav 9 ppm P efter ca. 2 timer. Det forventes, at det er muligt at anvende endnu lavere mængder af *F. oxysporum*-phospholipase (for eksempel 0,9 mg/kg olie) og stadig opnå god degummerings-ydeevne.

20

EKSEMPEL 18Degummering af vanddegummeret spiseolie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, der er opnået fra *Fusarium culmorum*

5

Der blev udført et forsøg ifølge "Generel procedure til udførelse af enzymatisk degummering" som beskrevet i eksempel 10 ovenfor.

Olie:

10

Vanddegummeret rapsfrøolie fra Aarhus Oliefabrik (AOM), Danmark.
Batch C00730/B01700, P-indhold 231 ppm.

Enzym:

15

Et fermenteringsmedium fra *Fusarium culmorum*.

En *Fusarium culmorum*-stamme blev dyrket og centrifugeret, og supernatanten blev oprenset som beskrevet nedenfor.

20

Podekulturer af stammen *Fusarium culmorum* CBS 513.94 (deponeringsdato den 25. oktober 1994) blev frembragt i 500 ml-rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende sammensætning:

Majsudblødningsvæske (tørret)	12 g/l
Glucose	24 g/l

25

Til hver kolbe tilsættes 0,5 g CaCO₃ og 0,5 ml olie. pH justeres til 5,5 før autoklavering.

30

Efter 3 dage ved 26 °C og 250 rpm blev 5 ml af hver af podekulturene podet i rystekolber, som indeholdt 100 ml af følgende medium:

35

Pepton, Difco 0118	6 g/l
Peptidase, Sheffield Products	4 g/l
Gærekstrakt, Difco 0127	3 g/l
Kødekstrakt, Difco 0126	1,5 g/l
Dextrose, Roquette 101-0441	1 g/l
Olivenolie, Sigma	10 g/l

pH justeres til 7,3-7,4 før autoklaving.

5 Dyrkning fandt sted i 9 dage ved 26 °C og 250 rpm. Medierne blev centrifugeret og filtreret (0,45 µm) og supernatanterne opsamlet og anvendt til degummeringsforsøgene, der er vist nedenfor.

Æstimeret aktivitet 200 PHLU/ml.

10 Forsøg: Enzymatisk degumming af en vanddegummet olie ved anvendelse af et phospholipase-præparat, som er opnået fra *Fusarium culmorum*

15 0,6 l (581 g) råapsfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 40 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 1,43 ml (5,7 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 5,5. Til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 1070 PHLU/kg olie) af en oprenset opløsning af phospholipase fra *F. culmorum*. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 18.

20 TABEL 18. Resultater fra degumming af råapsfrøolie med phospholipase fra *F. culmorum*

Tid (timer)	1070 U <i>F. culmorum</i> /kg olie P(ppm)
0	254
0,50	-
0,58	213
1,0	137
2,0	61
3,5	9
5,0	8
6,0	7

EKSEMPEL 19Enzymatisk degummering af råolie ved anvendelse af Degomma VOD5 Olie:

Rårapssfrøolie C00745/B01700, P-indhold 459 ppm.

Enzym:10 En kommerciel tilgængelig phospholipase Degomma VOD (Röhm, Tyskland),
æstimeret koncentration 10 mg/ml.

0,6 l (581 g) rårapssfrøolie tilføres udstyret og opvarmes til 50 °C. Til t = 30 minutter tilsættes 0,714 ml (2,86 mmol) 4 M NaOH-opløsning, som giver en pH på ca. 4,5. til t = 35 minutter tilsættes en passende mængde (det vil sige 3,6 mg/kg olie eller 7,1 mg/kg olie) af en oprenset opløsning af Degomma VOD-phospholipase. Det målte phosphorindhold i oliefasen efter centrifugering er vist i tabel 19.

TABEL 19

Tid	3,6 mg/kg olie	7,1 mg/kg olie
0	276	273
0,50	216	253
0,58	210	246
1,0	127	94
2,0	45	16
3,5	15	7
5,0	15	10
6,0	14	10

20

Dette eksempel viser, at Degomma VOD er i stand til at degummere en spiseolie. For at opnå en tilfredsstillende degummering af nævnte olie kræves imidlertid relativt høje doser af Degomma VOD sammenlignet med *Fusarium*-phospholipasen ifølge opfindelsen. Se for eksempel eksemplerne 16 og 17 til

sammenligning.

EKSEMPEL 20

- 5 Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et brødforbedrende middel

Materialer og metoder

- 10 Fremstilling af brød

Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

15	<u>Grundopskrift</u>	
	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
	Gær	4 %
	Salt	1,5 %
20	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

Bageprocedure

	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
25	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
30	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
	Hævning (32 °C, 82 % RH)	
	Kuvertbrød:	45 min.
35	Formbrød:	55 min.
	Bagning (230 °C)	
	Kuvertbrød:	22 min.

Formbrød: 35 min.

Vurdering af dej og bagte produkter

5 Egenskaberne for dejen og de bagte produkter blev bestemt som følger:

10 Specifikt volumen-indeks: Volumen af et brød eller et kuvertbrød måles ved hjælp af den traditionelle rapsfrø-fortrængningsmetode. Det specifikke volumen beregnes som volumen ml pr. g brød. Det specifikke volumen af kontrollen (uden enzym) defineres som 100. Det relative specifikke volumen-indeks beregnes som:

$$\text{Specifikt volumen-indeks} = \frac{\text{brødets specifikke volumen}}{\text{specifik volumen af kontrolbrød}} \times 100$$

15

Dejens klæbetilbøjelighed vurderes manuelt i overensstemmelse med følgende skala:

20	Kuvertbrødform:	meget flad	1
		flad	2
		normal	3
		god/rund	4
		meget god	5
		for rund	6

25

30

35

RESULTATER

TABEL 20

Enzym/ additiv								
A)					1	1	1	1
B)		500	1500	3000		500	1500	3000
C)	100	110	106	93	99	111	116	108
D)	100	106	99	94	102	107	109	103
E)	3	4	4	3	3	4	5	4,5

A) Lecimulthin 100 (g/kg mel)

B) F.o.-phospholipase (LU/kg mel)

C) Specifikt volumen-indeks (kuvertbrød)

D) Specifikt volumen-indeks (formbrød)

E) Kuvertbrødform (score)

Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Resultaterne viser en klar volumenforøgende effekt af *Fusarium oxysporum*-phospholipase på både kuvertbrød og formbrød ved opskriften, som ikke indeholder lecithin. Hvis lecithin indbefattes i opskriften, opnås endnu bedre volumeneffekter, selvom lecithin ikke selv bidrager til volumen. En statistisk analyse (ANOVA, $\alpha = 0,05$), som blev udført i Statgraphics Plus, release 3.0, viser en signifikant positiv synergi mellem phospholipasen og lecithinen.

Både med og uden lecithin i opskriften opnås en betydeligt forbedret form af kuvertbrød med *F. oxysporum*-phospholipasen. I dette eksempel opnåedes den bedste kuvertbrødform ved en blanding af lecithin og phospholipase (1500 LU/kg mel).

EKSEMPEL 21

Anvendelse af en phospholipase, der er opnået fra *F. oxysporum*, som et anti-friskhedstabende middel

Materialer og metoderFremstilling af brød

5 Europæiske almindeligt dej-hvidt brød og kuvertbrød blev fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

Grundopskrift

	Mel (Meneba BBZ)	100 % (2000 g)
	Vand	61 %
10	Gær	5 %
	Salt	1,5 %
	Sukker	1,5 %
	Ascorbinsyre	40 ppm

15 Bageprocedure

	Blanding (spiralblander), 625 rpm	3 min.
	Blanding (spiralblander), 1250 rpm	3,5 min.
	Vurdering af dej	7 min.
	Fermentering (stuetemperatur)	15 min.
20	Valsning/formning	3 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Sammenfoldning	2 min.
	Hvile ved stuetemperatur	5 min.
	Valsning/formning/i form	2 min.
25	Hævning (32 °C, 82 % RH)	55 min.
	Bagning (230 °C)	35 min.

30 I dette eksempel blev brødene anbragt i forme med låg for at undgå forskelle i de specifikke volumener før strukturanalyse. Efter nedkøling blev brødene opbevaret ved stuetemperatur, pakket i plastikposer.

Vurdering af bagte produkter

Vurdering af friskhedstab og struktur kan udføres ifølge AACC-metoden 74-09.

En vurdering af brødkrummers blødhed som indikator for brøds friskhedstab blev udført 0, 1, 3 og 7 dage efter bagning i overensstemmelse med følgende procedure:

En skive brød blev komprimeret ved konstant hastighed i en strukturanalyse (TA TX-2), og styrken af kompressionen blev målt i g. Krummens fasthed måles som styrken ved 25 % kompression. En brødkrummes fasthed stiger efterhånden som brødet mister friskhed.

Resultater

Resultaterne fra fasthedsmålinger som funktion af opbevaringsdage er vist i tabel 21. Lecimulthin blev tilsat i en koncentration på 1 g/kg mel, og *Fusarium oxysporum*-phospholipasen blev tilsat i en dosis på 500 U/kg mel. Hvert resultat i tabellen er gennemsnitsværdien for 6 målinger (2 brød, 3 målinger på hver).

TABEL 21

Enzym/additiv	Fasthed Dag 0	Fasthed Dag 1	Fasthed Dag 3	Fasthed Dag 7
Kontrol	223	350	631	1061
Lecimulthin 100*	225	261	532	1010
Phospholipase	201	303	573	1257
Lecimulthin 100* + phospholipase	169	304	468	834

*Kommercielt lecithin-præparat til bagning (Superfos, Danmark).

Som det fremgår af tabel 21, var brødene, der var behandlet med phospholipase, lidt blødere end kontrollen op til 3 dages opbevaring. I kombination med lecithin kunne der opnås en betydelig anti-friskhedstabende effekt under hele opbevaringen (som ikke er opnåelig med lecithin eller phospholipase alene).

SEKVENSLISTE

5 SEQ ID NO: 1 viser en klonet DNA-sekvens ifølge opfindelsen, som omfatter en DNA-sekvens, der koder for et enzym, som fremviser phospholipase-aktivitet.

(2) INFORMATION OM SEQ ID NO: 1

- 10 (i) SEKVENSEGENSKABER:
 (A) LÆNGDE: 1170 basepar
 (B) TYPE: nukleinsyre
 (C) BESKAFFENHED: enkeltstrenget
 (D) TOPOLOGI: lineær
- 15 (ii) MOLEKYLETYPE: cDNA
- (vi) NATURLIG OPRINDELSE:
 (A) ORGANISME: *Fusarium oxysporum*
 (B) STAMME: DSM 2672
- 20 (ix) EGENSKAB:
 (A) NAVN/KODE: CDS
 (B) PLACERING: 23..1063
- 25 (xi) SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 1

```

TTGGAGAATA TTCCTTGTCG CG ATG CTT CTT CTA CCA CTC CTC TCG GCC ATC      52
                Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile
                  1                5                10

ACC CTC GCG GTA GCC ACT CCT GTA GCT CTC GAC GAC TAC CTC AAC TCT      100
Thr Leu Ala Val Ala Ser Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser
                15                20                25

CTT CAG CAG CGA GCT GTT GGT GTC ACT ACA ACC GAC TTC AGC AAC TTC      148
Leu Glu Glu Arg Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe
                30                35                40

AAG TTC TAC ATC CAA CAC GCG GCC GCA GCT TAC TGC AAC TCT GAA GCC      195
Lys Phe Tyr Ile Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala

```

30

35

45	50	55	
GCA GCT GGT TCC AAG ATC ACC TGC TCC AAC AAT GGC TGT CCA ACC GTT			244
Ala Ala Gly Ser Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val			
60	65	70	
CAG GGC AAC GGA GCG ACC ATC GTG ACA TCT TTC GTT GGC TCC AAG ACA			292
Gln Gly Asn Gly Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr			
75	80	85	90
GGT ATC GGT GGC TAC GTC GCG ACA GAC TCT GCC CGA AAG GAA ATC GTC			340
Gly Ile Gly Gly Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val			
95	100	105	
GTC TCC TTC CGC GGA AGC ATC AAT ATT CGA AAC TGG CTT ACC AAC CTC			388
Val Ser Phe Arg Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu			
110	115	120	
GAC TTC GGC CAG GAA GAC TGC AGT CTC GTC TCT GGA TGC GGT GTG CAC			436
Asp Phe Gly Gln Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His			
125	130	135	
TCT GGC TTC CAG CGA GCC TGG AAT GAG ATC TGC TCT CAA GCA ACC GCT			484
Ser Gly Phe Gln Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala			
140	145	150	
GCT GTT GCC TCC GCC CGC AAG GCG AAC CCT TCT TTC AAC GTC ATT TCT			532
Ala Val Ala Ser Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser			
155	160	165	170
ACA GGC CAC TCC CTT GGA GGT GCC GTG GCC GTT CTT GCT GCC GCA AAC			580
Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn			
175	180	185	
TTG AGA GTC GGT GGA ACA CCC GTC GAT ATT TAC ACC TAC GCC TCT CCC			628
Leu Arg Val Gly Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro			
190	195	200	
CGT GTC GGA AAC GCG CAG CTC TCA GCC TTC GTC TCA AAC CAG GCT GGT			676
Arg Val Gly Asn Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly			
205	210	215	
GGA GAG TAC CGC GTT ACA CAC GCT GAT GAC CCT GTC CCC CGT CTC CCT			724
Gly Glu Tyr Arg Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro			
220	225	230	

C

- C

C

- | | | |
|----|------|---|
| 10 | (i) | SEKVENSEGENSKABER:
(A) LÆNGDE: 346 aminosyrer
(B) TYPE: aminosyre
(D) TOPOLOGI: lineær |
| 15 | (ii) | MOLEKYLETYPE: protein |
| | (xi) | SEKVENSBESKRIVELSE: SEQ ID NO: 2 |

Met Leu Leu Leu Pro Leu Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Val Ala Leu Asp Asp Tyr Val Asn Ser Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30
 Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45
 Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser Lys Ile
 50 55 60
 Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95
 Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg Gly Ser
 100 105 110
 Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
 115 120 125
 Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140
 Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser Leu Gly

165	170	175
Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr		
180	185	190
Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Gln		
195	200	205
Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg Val Thr		
210	215	220
His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr		
225	230	240
Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly Asp Lys		
245	250	255
Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn		
260	265	270
Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu		
275	280	285
His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp		
290	295	300
Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr		
305	310	315
Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys		
325	330	335
Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser		
340	345	

Patentkrav:

1. Polypeptid, som fremviser phospholipase A-aktivitet, der er valgt fra gruppen, som består af:

5

(a) et polypeptid, der kodes af den phospholipase A-kodende del af DNA-sekvensen, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

10

(b) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

(c) et polypeptid med en aminosyresekvens som vist i positionerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

15

(d) et polypeptid, der er mindst 70 % homologt med polypeptidet, der er defineret i (a), (b) eller (c).

2. Polypeptid ifølge krav 1, som er en phospholipase A1.

20

3. Polynukleotid, som omfatter en sekvens, der er valgt fra gruppen, som består af:

25

(a) den phospholipase A-kodende sekvens, der er klonet ind i plasmid pYES 2.0, som er til stede i *Escherichia coli*-DSM 11299,

(b) nukleotiderne 23-1063 i SEQ ID NO: 1,

(c) nukleotiderne 113-1063 i SEQ ID NO: 1,

30

(d) nukleotiderne 113-931 i SEQ ID NO: 1,

(e) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-346 i SEQ ID NO: 2,

35

(f) et polynukleotid, der koder for aminosyrerne 31-303 i SEQ ID NO: 2, og

(g) et polynukleotid, der er mindst 70 % homologt med et hvilket som helst

af ovennævnte polynukleotider, hvor polynukleotidet koder for et polypeptid, der fremviser phospholipase A-aktivitet.

- 5 4. Polynukleotid ifølge krav 3, der koder for et phospholipase A1-polypeptid.
- 5 5. Vektor, som omfatter polynukleotidet ifølge krav 3 eller 4.
6. Værtscelle, som omfatter vektoren ifølge krav 5.
- 10 7. Værtscelle ifølge krav 6, som er en eukaryotcelle, især en svampecelle, såsom en trådsvampecelle, for eksempel *Aspergillus* eller *Fusarium*.
8. Fremgangsmåde til frembringelse af en phospholipase A, som omfatter:
- 15 (a) dyrkning af værtscellen ifølge krav 6 eller 7 under betingelser, der er passende til ekspresion af phospholipasen og
- (b) indvinding af phospholipasen.
- 20 9. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces, som omfatter behandling af et phospholipid eller lysophospholipid med phospholipasen til hydrolysering af fedtacylgrupper.
- 25 10. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til reduktion af indholdet af phospholipid i en spiseolie, der har et phosphorindhold fra 50-250 ppm, som omfatter behandling af olien med polypeptidet til hydrolysering af en stor del af phospholipidet og separering af en vandfase, som indeholder det hydrolyserede phospholipid, fra olien.
- 30 11. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 1 eller 2 i en proces til frembringelse af et bagt produkt, som omfatter tilsætning af polypeptidet til en dej og bagning af dejen til frembringelse af det bagte produkt.

35

F.oxysporum	1	-ML	L	L	P	L	L	S	A	I	T	L	A	V	A	S	P	V	A	-	L	D	D	Y	V	N	S	L	E	E	R	A	31			
F.heterosporum	1	MML	V	L	S	L	L	S	I	I	A	F	T	A	A	G	P	V	P	S	V	D	E	N	T	R	V	L	E	H	R	A	33			
F.oxysporum	32	V	G	V	T	T	T	D	I	F	S	N	F	K	F	Y	I	Q	H	G	A	A	A	Y	C	N	S	E	A	A	G	S	K	I	64	
F.heterosporum	34	V	T	V	T	T	D	I	L	S	N	F	R	F	Y	L	Q	H	A	D	A	A	Y	C	N	F	N	T	A	V	G	K	P	V	66	
F.oxysporum	65	T	C	S	N	N	G	C	P	T	V	Q	G	N	G	A	T	I	V	T	S	F	V	G	S	K	T	G	I	G	Y	V	A	97		
F.heterosporum	67	H	C	S	A	G	N	C	P	D	I	E	K	D	A	I	V	V	G	S	V	V	G	T	K	T	G	I	G	A	Y	V	A	99		
F.oxysporum	98	T	D	S	A	R	K	E	I	V	V	S	F	R	G	S	I	N	I	R	N	W	L	T	N	L	D	F	G	Q	E	D	C	S	130	
F.heterosporum	100	T	D	N	A	R	K	E	I	V	V	S	V	R	G	S	I	N	V	R	N	W	I	T	N	F	N	F	G	Q	K	T	C	D	132	
F.oxysporum	131	L	V	S	G	C	G	V	H	S	G	F	Q	R	A	W	N	E	I	S	S	Q	A	T	A	A	V	A	S	A	R	K	A	N	163	
F.heterosporum	133	L	V	A	G	C	G	V	H	T	G	F	L	D	A	W	E	E	V	A	A	N	V	K	A	A	V	S	A	A	K	T	A	N	165	
F.oxysporum	164	P	S	F	N	V	I	S	T	G	H	S	L	G	G	A	V	A	V	L	A	A	N	L	R	V	G	T	P	V	D	I	196			
F.heterosporum	166	P	T	F	K	F	V	V	T	G	H	S	L	G	G	A	V	A	T	I	A	A	Y	L	R	K	D	G	F	P	F	D	L	198		
F.oxysporum	197	Y	T	Y	G	S	P	R	V	G	N	A	Q	L	S	A	F	V	S	N	Q	A	G	G	E	Y	R	V	T	H	A	D	D	P	228	
F.heterosporum	199	Y	T	Y	G	S	P	R	V	G	N	D	F	F	A	N	E	V	T	Q	Q	T	G	A	E	Y	R	V	T	H	G	D	D	P	231	
F.oxysporum	230	V	P	R	L	P	P	L	I	F	G	Y	R	H	T	T	P	E	F	W	L	S	G	G	G	G	D	K	V	D	T	I	S	262		
F.heterosporum	232	V	P	R	L	P	P	I	V	E	G	Y	R	H	T	S	P	E	Y	W	L	N	G	G	P	L	D	K	-	D	Y	T	I	S	263	
F.oxysporum	263	D	V	K	V	C	E	G	A	N	L	G	C	N	G	G	T	L	G	L	D	I	A	A	H	L	H	Y	F	Q	A	T	D	295		
F.heterosporum	264	E	I	K	V	C	E	G	I	A	N	V	M	C	N	G	G	T	I	G	L	D	I	L	A	H	I	T	Y	F	Q	S	M	A	296	
F.oxysporum	296	A	C	N	A	G	G	F	S	W	R	R	I	Y	R	S	A	E	S	V	D	K	R	A	T	M	T	D	A	E	L	E	K	K	L	326
F.heterosporum	297	T	C	A	P	I	A	I	P	W	K	R	I	D	M	S	D	E	E	L	E	K	K	L	316										
F.oxysporum	329	N	S	Y	V	Q	M	D	K	E	Y	V	K	N	N	Q	A	R	S	346																
F.heterosporum	318	T	O	Y	S	E	M	D	Q	E	F	V	K	Q	M	I	...	333																		

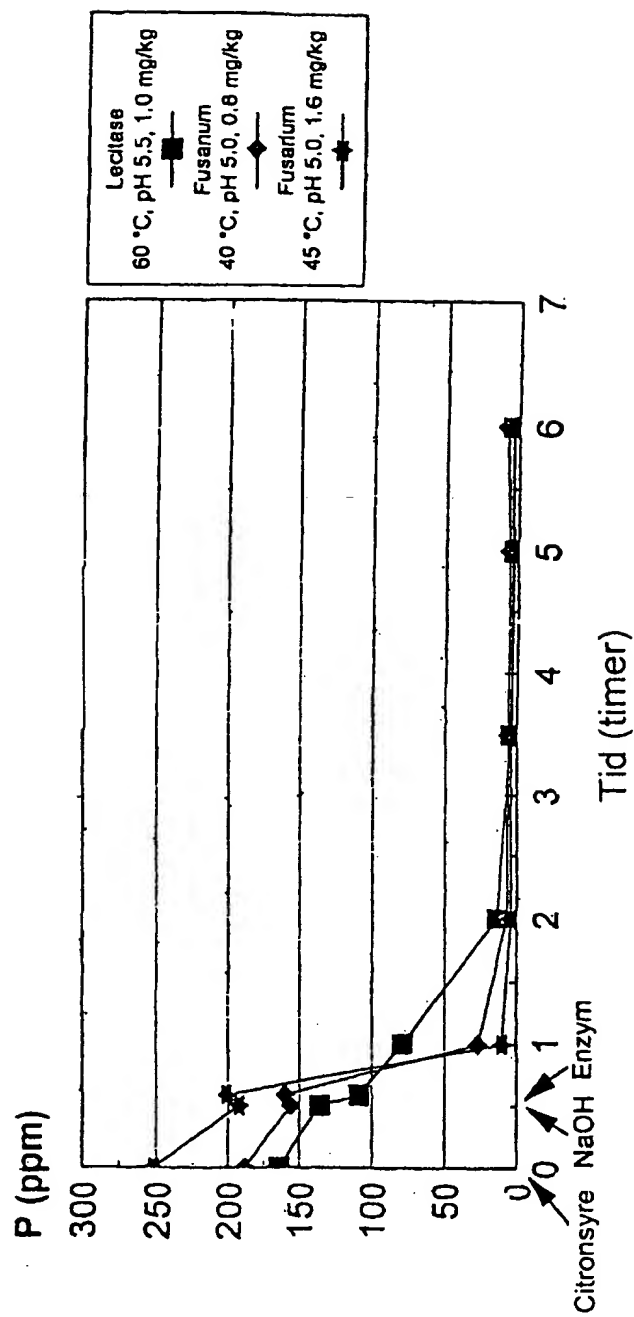
Fig. 1

112

1/2

Fig. 2 Oliedegummering - *Fusarium* PL vs. Lecitase

Vanddegummeret rapsfrøolie



Novozymes A/S
Att.: Mira Hansen
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd

31. SEP 2002

, MSH

Reference	Country
Agent MSH 01. OKT. 2002	Short title
Action	Term

Den 27. september 2002

Vi kvitterer hermed for modtagelse af sagsnr. p4798202dk, der skal oversættes fra engelsk til dansk.

Vi bekræfter samtidig, at fristdatoen er den 6. december 2002.

Med venlig hilsen
Lingtech A/S


Kristina Breyen

<input type="checkbox"/> ENGELSK		<input type="checkbox"/> TYSK		<input type="checkbox"/> FRANSK OVERSETTELSE		<input checked="" type="checkbox"/> T. DANSK	
Fra firma		Novozymes A/S					
Dato		24/9-2002					
Side- antal	Ialt	Beskr.	Krav	Sm.drag	Tegn.	Andet	
Fremsendt af		Mira S. Hansen					
Sagsnummer		4798.202-EP/DK					
Sagsbehandler		Sten L. Knudsen					
Sagsområde		Lipase					
Ønskes retur (dato)		6/12-2002					
Evt. forslag til hvem der skal oversætte							
Evt. bem. vedr. terminologi							
UDFYLDES AF LINGTECH							
Oversætter							
Sendt dato				Frist dato			
Retur dato				Antal ord			
Afr.bil.nr.				Fakt.nr.			
Bem.							

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.